

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Obstetricia y Ginecología



TESIS DOCTORAL

Polimorfismos genéticos del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y del precursor del péptido natriurético B (NPPB) asociados a preeclampsia

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Manuel Dúarez Coronado

Directores

Miguel Ángel Herraiz Martínez

Nieves Martell Claros

Marta Vidaurreta Lázaro

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Obstetricia y Ginecología



**POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF) Y
DEL PRECURSOR DEL PÉPTIDO NATRIURÉTICO B
(NPPB) ASOCIADOS A PREECLAMPSIA**

TESIS DOCTORAL

MANUEL DUÁREZ CORONADO

MADRID, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



**Polimorfismos genéticos del factor de crecimiento
vascular endotelial (VEGF) y del precursor del
péptido natriurético B (NPPB) asociados a
preeclampsia**

TESIS DOCTORAL

AUTOR:

Manuel Duárez Coronado

DIRECTORES:

Miguel Angel Herraiz Martínez

Nieves Martell Claros

Marta Vidaurreta Lázaro

AGRADECIMIENTOS

La elaboración de esta tesis no habría sido posible, sin la valiosa colaboración de muchas personas que me han ayudado a conseguir este reto, y que merecen todo mi agradecimiento:

Al Prof. Miguel Angel Herraiz Martinez, catedrático de Ginecología y Obstetricia de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, Jefe del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Clínico San Carlos, director de esta tesis, por haberme dado la oportunidad de iniciar esta investigación, brindándome toda la confianza y motivación necesarias en este proceso.

Al Prof. José Antonio Vidart Aragón, catedrático de Ginecología y Obstetricia de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, ex-Jefe del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Clínico San Carlos, por haberme permitido formar parte de su equipo, y de quien he recibido la confianza para poder desarrollarme profesionalmente.

A la Dra Nieves Martell Claros, profesora asociada de la Facultad de Medicina de la Universidad complutense de Madrid, Jefa de Sección de la Unidad de Hipertensión del Hospital Clínico San Carlos, directora de esta tesis; agradecerle sinceramente por su dedicación, entusiasmo y buenos consejos.

A la Dra Marta Vidaurreta Lázaro, del Laboratorio de Genómica del Hospital Clínico San Carlos, mil gracias por su tiempo, dedicación y asesoramiento magistral desde el inicio de la investigación hasta la elaboración final del informe de tesis.

Agradecer también a todo el equipo del laboratorio de Genómica (Silvia Venganzones, Sara Rafael y Virginia de la Orden), por estar siempre dispuestas a ayudarme con la mejor disposición, en la recepción y procesamiento de las muestras.

A la Dra Cristina Fernández, por su buena disposición y amabilidad a la hora de recibirme, así como su inestimable ayuda en la interpretación y comprensión del análisis estadístico.

A todos mis residentes pequeños, en especial a Alba Miranda, Diana Cuenca y Sainza Barroso por haber participado desinteresadamente en el reclutamiento de pacientes y la toma de muestras.

Finalmente, quiero dedicar esta tesis a mi familia: a Arantza por amarme, soportarme y ayudarme a superar los obstáculos propios de esta etapa; y a nuestro pequeño Ignacio, que con su sonrisa ilumina mi vida y me motiva a esforzarme cada día por ser mejor médico y persona. A mis padres, Alicia y Vital, mi agradecimiento infinito por inculcar en mí el amor por el estudio, por darme ejemplo de lucha y sacrificio constantes, y por su amor incondicional que me ha permitido ir en busca de mis sueños.

Para Arantza e Ignacio

Índice

I. RESUMEN/SUMMARY.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	12
II.1. IMPACTO DE LA PREECLAMPSIA EN LA SALUD MATERNOOPERINATAL.....	13
II.2. Definición y clasificación de preeclampsia.....	15
II.2.1. Definición.....	15
II.2.2. Definiciones operacionales en preeclampsia.....	17
II.2.3. Clasificación de la preeclampsia.....	21
II.2.3.1. <i>Preeclampsia grave versus preeclampsia leve</i>	21
II.2.3.2. <i>Preeclampsia precoz versus preeclampsia tardía</i>	23
II.3. FISIOPATOLOGÍA Y ETIOLOGÍA MULTIFACTORIAL DE LA PREECLAMPSIA.....	26
II.3.1. Anormalidades en el proceso de la placentación.....	27
II.3.1.1. <i>Oleadas de invasión trofoblástica</i>	28
II.3.1.2. <i>Fallo de la invasión trofoblástica y establecimiento de una deficiente circulación placentaria</i>	29
II.3.2. Disfunción endotelial materna sistémica. Factores angiogénicos y antiangiogénicos.....	30
II.4. BASE GENÉTICA DE LA PREECLAMPSIA.....	32
II.4.1. Estudios en gemelos.....	33
II.4.2. Determinación de la susceptibilidad a la preeclampsia en función del genotipo materno y paterno.....	35
II.4.3. Pantallas de mapeo genético.....	36
II.4.4. Genes candidatos posicionales.....	37
II.4.5. Mapeo de asociación amplia del genoma.....	38
II.4.6. Enfoque de genes candidatos basados en la fisiopatología.....	39
II.5. ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL CON LA PREECLAMPSIA.....	40
II.5.1. Factores angiogénicos y antiangiogénicos en la preeclampsia: papel del factor de crecimiento vascular endotelial.....	40
II.5.2. Polimorfismos genéticos del gen del factor de crecimiento vascular endotelial asociados a preeclampsia.....	44
II.6. ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DEL PRECURSOR DEL PÉPTIDO NATRIURÉTICO TIPO B CON LA PREECLAMPSIA.....	47
II.6.1. Péptidos natriuréticos y preeclampsia.....	47

II.6.2. Polimorfismo genético del precursor del péptido natriurético tipo B asociado a preeclampsia.....	50
III. HIPÓTESIS	52
IV. OBJETIVOS.....	54
V. PACIENTES Y MÉTODO.....	56
V. 1 POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	56
V.2. METODOLOGÍA.....	58
V.2.1. Metodología clínica.....	58
V.2.2. Metodología analítica.....	59
V.2.2.1. Extracción y cuantificación del ácido desoxirribonucleico.....	59
V.2.2.2. Estudio de los polimorfismos del gen del factor de crecimiento vascular endotelial.....	60
V.2.2.2. Estudio del polimorfismo del gen del precursor del péptido natriurético Tipo B.....	66
V.2.3. Metodología estadística.....	66
VI. RESULTADOS.....	68
VI.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN.....	69
VI.2. DESCRIPCIÓN DE LOS GENOTIPOS Y ALELOS DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL.....	76
VI.3. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA Y DE LA FRECUENCIA ALÉLICA DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN VEGF CON LA PREECLAMPSIA, SU GRAVEDAD Y EDAD GESTACIONAL DE APARICIÓN.....	80
VI.3.1. Normotensas versus Preeclámpticas.....	80
VI.3.2. Normotensas versus Preeclámpticas leves y graves.....	82
VI.3.3. Normotensas versus Preeclámpticas precoz y tardías.....	84
VI.4. DESCRIPCIÓN DE LOS GENOTIPOS Y ALELOS DEL POLIMORFISMO DEL GEN DEL PRECURSOR DEL PÉPTIDO NATRIURÉTICO TIPO B.....	84
VI.5. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE LOS GENOTIPOS Y ALELOS DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN NPPB CON LA PREECLAMPSIA, SU GRAVEDAD Y EDAD GESTACIONAL DE APARICIÓN.....	86
VI.5.1. Normotensas versus Preeclámpticas.....	88
VI.5.2. Normotensas versus Preeclámpticas leves y graves.....	88
VI.5.3. Normotensas versus Preeclámpticas precoz y tardías.....	88
VI.6. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE CADA ALELO CLASIFICADO COMO HOMOCIGOTO, HETEROCIGOTO Y OTROS, DEL GEN NPPB CON LA PREECLAMPSIA Y SU SEVERIDAD.....	91
VI.6.1. Análisis de la relación de los genotipos del alelo 7 del gen NPPB con la preeclampsia y su severidad.....	91
VI.6.2. Análisis de la relación de los genotipos del alelo 9 del gen NPPB con la preeclampsia y su severidad.....	93

VII. DISCUSION.....	95
VIII. CONCLUSIONES.....	110
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	112

I. RESUMEN

Introducción

La preeclampsia es una enfermedad multisistémica, que afecta al 6-8% de los embarazos y permanece como la primera causa de morbilidad materno perinatal en los países desarrollados. Está definida por la aparición de hipertensión y proteinuria, a partir de las 20 semanas de gestación; asociada a complicaciones maternas y fetales severas, tales como: insuficiencia renal, insuficiencia hepática, edema cerebral, bajo peso al nacer, prematuridad, y en algunos casos a muerte materno fetal.

Se cree actualmente que la preeclampsia se desarrolla en dos etapas. En la primera etapa, se produce una placentación anormal consistente en una invasión superficial del citotrofoblasto y por tanto una insuficiente vascularización placentaria, lo que genera una producción anormal de factores angiogénicos y antiangiogénicos placentarios inducidos por hipoxia. En la segunda etapa, que se desarrolla en la segunda mitad del embarazo, tiene lugar la liberación de estos factores placentarios a la circulación sistémica, causando provocando una disfunción endotelial generalizada.

Dado que el VEGF juega un papel fundamental en la vasculogénesis y angiogénesis del embrión y la placenta, participando en el desequilibrio angiogénico/antiangiogénico presente en la preeclampsia, y que los péptidos natruiréticos incrementan sus niveles de forma significativa en mujeres preeclámpsicas, en comparación con normotensas; nos hemos planteado estudiar los polimorfismos genéticos de base única presentes en el gen del VEGF (-2578C/A, -1154G/A y +936C/T) y el polimorfismo de repetición en tándem (TTTC)_n del gen NPPB, y su probable relación con el desarrollo de la preeclampsia.

Pacientes y método

Se ha realizado un estudio de casos y controles, en una población de 150 gestantes, atendidas conjuntamente por la Unidad de Alto Riesgo del Servicio de Obstetricia y la Unidad de Hipertensión Arterial del Servicio de Medicina Interna del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, durante el período de 2008-2012.

Reclutamos a 59 pacientes con diagnóstico de preeclampsia, que cumplieron con los siguientes **criterios de inclusión**:

- Tensión Arterial $\geq 140/90$, en más de 2 ocasiones separadas por 6 horas, tomada con la paciente sentada, considerando la medida de tensión arterial diastólica cuando desaparecen los sonidos del latido cardíaco (V fase de Korotkow), siguiendo la metodología recomendada por la SEGO.
- Proteinuria significativa ≥ 300 mg medida en orina recogida durante 24 horas.

Éstas a su vez, se clasificaron en dos grupos: *preeclampsia grave* y *preeclampsia leve*, si cumplían o no algunos de los siguientes criterios de gravedad: tensión arterial $\geq 160/110$, en más de 2 ocasiones separadas por 6 horas; proteinuria masiva ≥ 2 gramos, medida en orina recolectada durante 24 horas, cefalea, alteraciones visuales o dolor epigástrico, eclampsia, cianosis o edema pulmonar, hemorragia retiniana o papiledema, creatinina sérica $> 1,2$ mg/dl; enzimas hepáticas elevadas; plaquetas $< 100\ 000$ /dl, anemia hemolítica microangiopática; crecimiento intrauterino retardado. (Documentos de consenso, SEGO 2007)

También fueron clasificadas en *preeclampsia de aparición precoz y tardía*, según se hiciera el diagnóstico con menos de 34 semanas, o con 34 o más semanas de edad gestacional, respectivamente.

Como grupo control, seleccionamos al azar, a 91 mujeres multíparas, con al menos dos embarazos a término no complicados de bajo riesgo, que no hubieran presentado criterios diagnósticos de hipertensión arterial en ninguno de sus embarazos.

Se obtuvo una muestra de sangre en EDTA. De este tubo de sangre se procedió a la extracción del ADN para el análisis de los polimorfismos.

La determinación de los polimorfismos -2578C/A, -1154G/A y +936C/T del gen VEGF se realizó mediante reacción de cadena polimerasa (PCR) a tiempo real. Para esta reacción se emplearon primers específicos para acotar la región de interés y sondas

específicamente diseñadas para discriminar las dos variantes alélicas con marcaje diferencial. La determinación del polimorfismo de repetición TTTC del gen NPPB, se realizó mediante electroforesis en un gel Genetic Analyzer POP4 utilizando ABI 3100 (PE Applied Biosystems)

Resultados

Al comparar las características clínicas, entre las gestantes normotensas y las que presentaron preeclampsia leve y grave no se encontraron diferencias significativas en relación a edad materna, raza, índice de masa corporal (IMC) y tabaquismo. Tampoco se encontraron diferencias entre las normotensas y las que tuvieron preeclampsia precoz y tardía, en estos parámetros.

Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en los resultados perinatales. Hubo una alta tasa de cesáreas en el grupo de mujeres con preeclampsia grave (84,8%) respecto al grupo de mujeres con preeclampsia leve (54,7%), y también respecto a las normotensas (9,9%), (**p < 0,001**). Del mismo modo, una mayor tasa de cesáreas en el grupo de en el grupo de preeclampsia precoz (92,3%) respecto al grupo de preeclampsia tardía (67,4%) y también a las normotensas (9,9%) (**p < 0,001**).

Así mismo, los recién nacidos de madres con PE grave tuvieron menor edad gestacional (34,8 semanas) y peso al nacer (2266 gramos) que aquellos recién nacidos de madres con PE leve (38,3 semanas, 3008 gramos) y de aquellos recién nacidos de madres normotensas (39,29 semanas, 3297 gramos) (**p < 0,001**). La edad gestacional y peso al nacer fueron significativamente menores en el grupo de PE precoz (32,5 semanas, 2090 gramos), respecto al grupo de PE tardía (37,4 semanas, 2735 gramos) y de éste a su vez con el grupo de normotensas (39,3 semanas, 3297 gramos) (**p < 0,001**).

La distribución genotípica de polimorfismos cumplió el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo de normotensas y preeclámpticas, como requisito previo para el análisis de asociación.

Al comparar la distribución de alelos y genotipos de los tres polimorfismos del gen VEGF estudiados no encontramos diferencias significativas entre pacientes preeclámplicas respecto del grupo control de normotensas, siendo las frecuencias muy similares en todos los grupos (-2578 A/C, $p=0,54$; -1154 A/G, $p=0,59$ y +936 C/T, $p=0,99$). Tampoco encontramos diferencias significativas cuando se comparó los subgrupos de preeclampsia grave, preeclampsia leve, preeclampsia precoz, preeclampsia tardía respecto al grupo de normotensas.

En el estudio del polimorfismo de repetición del gen NPPB, hemos encontrado diez alelos distintos, que van desde 6 repeticiones cortas (TTTC) hasta 16 repeticiones, sin encontrar ninguno de 15 repeticiones (alelos 6,7,8,9,10,11,12,13,14,16). Estos alelos se hallaron combinados en diecinueve genotipos diferentes, que se distribuyeron de forma asimétrica, siendo más frecuentes los portadores del homocigoto 7/7 (52,8 % de normotensas y 42,4 % de preeclámplicas).

Cuando comparamos la distribución de alelos y genotipos del polimorfismo de repetición del gen NPPB, no encontramos diferencias significativas entre mujeres con PE leve, grave y normotensas ($p=0,05$). Tampoco hubo diferencias significativas al comparar PE precoz y tardía.

Encontramos diferencias significativas, al comparar la distribución de genotipos del alelo 7, clasificándolos como homocigoto 7, heterocigoto 7 y otros genotipos distintos, entre las gestantes preeclámplicas respecto a las normotensas (**$p=0,038$**). Encontrando una mayor frecuencia de heterocigotos 7 en las pacientes preeclámplicas (47,4 %) que en las normotensas (29,2%); y una menor frecuencia de otros genotipos distintos al 7, en las preeclámplicas (10,1 %), que en las normotensas (22,5 %). El odds ratio de las portadoras heterocigotas 7 respecto a las portadoras de otros genotipos distintos fue 2,24 (IC 95%: 1,06-4,74) (**$p=0,015$**).

Discusión

En correlación a lo reportado por Garza-Veloz et al, y a dos metanálisis recientes, comunicados por Cheng D et al y Song GG et al, nuestro estudio tampoco encontró ninguna asociación entre la distribuciones alélicas y genotípicas de los polimorfismos -2578 C/A, -1154 G/A, con el riesgo de presentar preeclampsia, con la severidad de la enfermedad (preeclampsia grave o leve), ni con la edad gestacional de aparición de la misma (preeclampsia precoz y tardía).

Nosotros tampoco hallamos una asociación significativa entre las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo +936 y el riesgo de padecer PE en el embarazo, ni con la severidad y el momento de aparición de la enfermedad. Al respecto, Song et al, demostró en su metaanálisis que el alelo +936 T no se asocia a un riesgo aumentado de PE en mujeres europeas; sin embargo esta asociación es significativa cuando se trata de mujeres asiáticas.

En contraposición, el metaanálisis de Cheng et al y el estudio caso-control de Shim et al, encuentran una asociación significativa para el polimorfismo + 936, por la cual las mujeres portadoras del alelo T tienen más alto riesgo de presentar PE, que las portadoras del genotipo +936 CC.

Nuestro hallazgo, de una significativa mayor frecuencia de heterocigotos 7 en las pacientes preeclámpicas (47,4 %) que en las normotensas (29,2%) OR= 2,24 IC 95%: 1,06-4,74) (**p=0,015**), sugiere que las portadoras del genotipo homocigoto 7 tienen un riesgo incrementado de desarrollar preeclampsia. No disponemos de más estudios al respecto, que el realizado por Szabó et al, quien encontró resultados distintos, reportando que las mujeres preeclámpicas tenían una significativa mayor frecuencia de genotipos y alelos de 11 repeticiones.

En conclusión, la presencia de los genotipos de 7 repeticiones del polimorfismo del gen NPPB, se asoció significativamente al riesgo de padecer preeclampsia en nuestra población de estudio. Las distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos del gen VEGF estudiados, -2578 C/A, -1154 G/A y +936 C/T, en cambio, no se asociaron con el riesgo de padecer preeclampsia en el embarazo.

SUMMARY

Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor (VEGF) and natriuretic peptide precursor B (NPPB) associated with preeclampsia

Preeclampsia is a multisystemic disease, which complicates 6-8% of pregnancies and remains a leading cause of maternal and perinatal morbidity and mortality in developed countries. It is defined by the occurrence of hypertension and proteinuria after 20 weeks of gestation; associated with severe maternal and fetal complications, such as: kidney failure, liver failure, cerebral edema, low birth weight, prematurity, and in some cases, maternal and fetal death.

It is currently believed that preeclampsia develops in two stages. In the first stage, an abnormal placentation consisting of a shallow cytotrophoblast invasion and, therefore, an insufficient placental vascularization occurs, generating an abnormal production of placental angiogenic and antiangiogenic factors induced by hypoxia. In the second stage, which takes place in the second half of pregnancy, the release of these placental factors acting on maternal endothelium cause systemic endothelial dysfunction.

Since VEGF plays a central role in vasculogenesis and angiogenesis of the embryo and placenta, and it is also involved in angiogenesis/antiangiogenesis imbalance present in preeclampsia, and natriuretic peptide levels increased significantly in preeclamptic women compared with normotensive pregnant women; we intend to study the single base polymorphisms of the gene VEGF (-2578C/A, -1154G/A and +936C/T) and the tandem repeat polymorphism of the gene NPPB, and its likely relation with preeclampsia.

Patients and method.

We performed a case-control study in a population of 150 pregnant women, who were enrolled from High Risk Obstetrical Unit and Hypertension Unit of Internal Medicine of the Hospital Clínico San Carlos de Madrid, during the period 2008-2012.

We recruited 59 patients diagnosed with preeclampsia, who met the following inclusion criteria:

- Blood pressure $\geq 140/90$, at least twice with a 6 hour lapse between measurements, taken with the patient seated, considering the diastolic blood pressure when the sounds of the heartbeat disappear (phase V Korotkoff), as recommended by the SEGO.
- Significant proteinuria ≥ 300 mg measured in urine collected in 24 hours.

These women, were divided into two groups: severe preeclampsia and mild preeclampsia, according to the following criteria of severity: blood pressure $\geq 160/110$, at least twice with a 6 hour lapse between measurements; massive proteinuria ≥ 2 g, measured in urine collected in 24 hours, headache, visual disturbances or epigastric pain, eclampsia, pulmonary edema or cyanosis, papilledema or retinal hemorrhage, serum creatinine > 1.2 mg/dl; elevated liver enzymes; platelets $< 100,000$ /dl, microangiopathic hemolytic anemia; intrauterine growth retardation.

They were also classified as *early-onset and late-onset preeclampsia*: *early-onset preeclampsia* if developed before 34 weeks of gestation and *late-onset preeclampsia* if developed at or after 34 weeks of gestation.

As a control group, we randomly selected 91 multiparous women, with at least two uncomplicated low-risk full term pregnancies, that have not submitted diagnostic criteria of hypertension in any of their pregnancies.

A blood sample in EDTA was obtained of each patient. This blood tube proceeded to the extraction of DNA for analysis of polymorphisms.

The exam of the VEGF gene polymorphisms -2578C/A, -1154G/A and + 936C/T was performed using polymerase chain reaction (PCR) in real time. Specific primers were used to delimit the region of interest, and probes specifically designed were used to discriminate the two allelic variants with differential labeling. The exam of the

repeat polymorphism of NPPB TTTC gene was performed by gel electrophoresis using POP4 Genetic Analyzer ABI 3100 (PE Applied Biosystems)

Results

When comparing the clinical characteristics between normotensive pregnant women with those who presented mild and severe preeclampsia, and with those who had early-onset and late-onset preeclampsia, no significant differences were found, in relation to maternal age, race, body mass index (BMI) and smoking.

However, significant differences in perinatal outcomes were found. There was a high rate of Caesarean sections in the group of women with severe preeclampsia (84.8%) compared to the group of women with mild preeclampsia (54.7%), and also compared to normotensive patients (9.9%), ($p < 0,001$). Similarly, a higher rate of Caesarean sections in the group of early-onset preeclampsia patients was seen (92.3%) compared to late-onset preeclampsia group (67.4%) and also to normotensive patients (9.9%) ($p < 0,001$).

Also, newborns from mothers with severe preeclampsia had lower gestational age (34.8 weeks) and birth weight (2266 grams) than newborns from women with mild preeclampsia (38.3 weeks, 3008 grams) and than those of normotensive mothers (39.29 weeks, 3297 grams) ($p < 0.001$). Gestational age and birth weight were significantly lower in the group of early-onset preeclampsia (32.5 weeks, 2090 grams), compared to late-onset PE group (37.4 weeks, 2735 grams) and also compared to the group of normotensive (39.3 weeks, 3297 grams) ($p < 0.001$).

The genotype distribution of polymorphisms fulfilled the principle of Hardy-Weinberg equilibrium in normotensive and preeclamptic group as a prerequisite for analysis.

Comparing the distribution of genotypes of the three VEGF gene polymorphisms studied between the control group and preeclamptic patients, there

were no significant differences, with similar frequency in all groups (-2578 A / C, $p = 0.54$, -1154 A / G, $p = 0.59$ and +936 C / T, $p = 0.99$).

In the study of polymorphism NPPB repeat gene, we found ten different alleles, ranging from 6 short repetitions (TTTC) to 16 repetitions without finding any of 15 repetitions (alleles 6,7,8,9,10,11,12,13,14,16). These alleles were found combined in nineteen different genotypes, which were distributed asymmetrically, being more frequent homozygous carriers 7/7 (52.8% from 42.4% in normotensive and preeclamptic patients).

When we compare the distribution of alleles and genotypes NPPB repeat polymorphism gene, no significant differences were found between women with mild preeclampsia, severe preeclampsia and normotensive pregnant ($p = 0.05$). There were also no significant differences when comparing early and late PE differences.

We found significant differences, by comparing the distribution of allele 7, classified as homozygous 7, heterozygous 7, and other genotypes, between preeclamptic patients and normotensive pregnant (**$p = 0.038$**). We noted an increased frequency of heterozygotes 7 in preeclamptic patients (47.4%) more than in normotensive (29.2%); and a lower frequency of the other genotypes 7 in preeclamptic women (10.1%) than in normotensive (22.5%). The odds ratio of heterozygous 7 carriers compared to other different genotypes was 2.24 (95% CI 1.06 to 4.74) (**$p = 0.015$**).

Discussion

In correlation to the reported by Garza-Veloz et al, and two recent meta-analysis reported by Cheng D et al and Song GG et al, our study also found no association between allelic distribution and genotypic SNPs -2578 C/A, -1154 G/A, with the risk of preeclampsia, with the severity of the disease (severe or mild preeclampsia) or with gestational age of onset (early onset and late onset preeclampsia).

We also found no significant association between genotype and allele frequencies +936 polymorphism and the risk of PE in pregnancy or with the severity and time of onset of the disease. In this regard, Song et al, in their meta-analysis demonstrated that +936 T allele is not associated with an increased risk of PE in European women; however this association is significant when it comes to Asian women.

In contrast, the meta-analysis of Cheng et al, and case-control study of Shim et al, found a significant association for polymorphism + 936, whereby women carriers of the T allele are at greater risk of PE, than carriers of +936 CC genotype women.

Our finding of a significantly higher frequency of heterozygotes 7 in preeclamptic patients (47.4%) than in normotensive patients (29.2%) OR = 2.24 95% CI 1.06 to 4.74) (p = 0.015), suggests that an homozygote 7 status increases the risk of developing preeclampsia. In this regard, we only have one study, conducted by Szabo et al, who found different results, reporting that preeclamptic women had a significantly higher frequency of genotypes and alleles of 11 repetitions.

In conclusion, the presence of genotypes 7 of NPPB gene polymorphism was significantly associated with higher risk of preeclampsia in our study population. The allelic and genotypic distribution of VEGF gene polymorphisms studied, -2578 C/A, -1154 G/A and +936 C/T, however, were not associated with risk of preeclampsia during pregnancy.

II.INTRODUCCIÓN

II.1. IMPACTO DE LA PREECLAMPSIA EN LA SALUD MATERNO PERINATAL

La preeclampsia es un síndrome multisistémico, que se manifiesta en la segunda mitad del embarazo, causando un importante impacto sobre la morbilidad materna y perinatal. Constituye un problema de salud pública puesto que afecta al 2-8% de todos los embarazos y continúa siendo una de las principales causas de mortalidad materna en el mundo^{1, 2}.

A nivel mundial, se calcula que la enfermedad hipertensiva del embarazo es responsable de 50.000 muertes maternas cada año. Contribuye también significativamente a la morbilidad perinatal, sobre todo como consecuencia de ocasionar crecimiento intrauterino restringido (CIR) y parto prematuro; produciendo globalmente 900.000 muertes perinatales al año³.

En América Latina y el Caribe, los estados hipertensivos del embarazo son responsables de casi el 26% de las muertes maternas, mientras que en África y Asia contribuyen al 9% de dichas muertes. Aunque en términos absolutos, la mortalidad materna es significativamente menor en los países desarrollados, la preeclampsia sigue siendo la primera causa de morbilidad materna y perinatal (ocasionando el 16% de las muertes maternas en los países industrializados) y se calcula un importante incremento de esta patología en los próximos años, debido a un aumento de los embarazos mediante técnicas de fertilización in vitro, en mujeres mayores de 35 años².

La preeclampsia ha aumentado en los Estados Unidos de Norteamérica, hallazgo que podría estar relacionado con una mayor prevalencia de trastornos predisponentes, como la hipertensión crónica, diabetes mellitus y obesidad^{4,5}. Algunos grupos étnicos (por ejemplo, afroamericano y filipino) y el bajo nivel socioeconómico se asocia también con un elevado riesgo de desarrollar la enfermedad^{6,7}.

La preeclampsia grave es una causa importante de morbilidad materna severa (como por ejemplo de accidente cerebrovascular y ruptura hepática) y de resultados perinatales adversos, como la prematuridad y el CIR. Aunque las convulsiones generalizadas de la eclampsia afectan a 3 mujeres por cada 10.000 nacimientos en Europa, esta patología es 10 a 30 veces más frecuente en los países en vías de desarrollo⁸.

En España, se ha descrito una incidencia notoriamente más baja de preeclampsia en comparación con los países anglosajones o con Norteamérica. Comino et al, encontraron una incidencia de enfermedad hipertensiva del embarazo (EHE) de 2,23 % en base a un estudio multicéntrico realizado en 23 hospitales españoles en 1.986; de ellos, el 1,1% correspondía a preeclampsia, el 0,4% a hipertensión crónica, el 0,3% a preeclampsia sobreañadida a hipertensión crónica y el 0,5% a hipertensión transitoria. La frecuencia de la preeclampsia leve fue del 74,9% y la de la preeclampsia grave fue del 25,1%. La eclampsia, el trastorno más grave de la EHE, aconteció en el 0,03%⁹.

Posteriormente, el mismo autor publicó un estudio poblacional que incluye la mitad de los partos asistidos en Andalucía durante 1.991, siendo la frecuencia global de EHE del 2,59 %¹⁰.

Un estudio más reciente, encuentra una frecuencia similar de EHE, del 2,55%, en una población de 2.546 gestantes asistidas en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid entre el 2.001 y el 2.003. Determinaron también en dicha población de gestantes, que las mujeres nulíparas de 35 o más años de edad, con nivel educativo medio o alto y que trabajan fuera del hogar o aquellas pertenecientes a la etnia gitana tenían mayor riesgo de padecer una EHE¹¹.

Respecto al impacto en la morbimortalidad materna en nuestro medio, Curiel-Balsera et al, en un estudio prospectivo realizado en una unidad de cuidados intensivos ginecoobstétricos, entre 1.999 y el 2.008 (65.503 partos), encontró una incidencia de preeclampsia grave, incluyendo síndrome HELLP (hemólisis, elevación de enzimas

hepáticas y plaquetopenia) y eclampsia, de 4 por 1.000 partos, con una mortalidad materna de 1,5%, y una tasa de complicaciones graves del 14%, que incluyó casos de fracaso cardíaco en 9%, insuficiencia renal aguda en 5% y coagulopatía en 2%¹².

II.2. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LA PREECLAMPSIA

II.2.1.- DEFINICIÓN

La preeclampsia es un trastorno multisistémico propio del embarazo humano, que se desarrolla como consecuencia de una disfunción endotelial sistémica, manifestándose a partir de la semana 20 de la gestación, como hipertensión arterial y proteinuria significativa.

La PE se clasifica dentro de un grupo de enfermedades conocidas como estados hipertensivos del embarazo (EHE), que pueden complicar hasta el 15% de los embarazos, causando un importante impacto en la salud materna y perinatal. La clasificación más aceptada es la propuesta por el Programa Nacional para educación en Hipertensión del Instituto Nacional del Corazón, Pulmón y Sangre, en colaboración con el Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos (ACOG) expuesto en la tabla 1¹³.

Es muy importante hacer un diagnóstico preciso de preeclampsia, diferenciándola de los otros tipos de EHE, ya que tiene un peor pronóstico materno perinatal.

La definición y el diagnóstico de la preeclampsia, se sigue basando en sus manifestaciones clínicas, ya que aún no hemos descubierto la causa primaria común del trastorno y por lo tanto no disponemos de ninguna prueba específica de diagnóstico.

Tabla 1. Clasificación de los estados hipertensivos del embarazo (EHE)

1.-Hipertensión Crónica: Hipertensión presente antes del embarazo o antes de la semana 20 del mismo y/o que persiste a las 12 semanas del parto.

2.- Hipertensión Gestacional: Hipertensión sin proteinuria que es diagnosticada después de la semana 20 del embarazo y desaparece después de la semana 12 postparto. También denominada hipertensión transitoria.

3.- Preeclampsia/Eclampsia: Hipertensión más proteinuria después de la semana 20 de embarazo (excepto enfermedad trofoblástica, embarazo múltiple o hidrops), y que se normaliza dentro de las 12 semanas del postparto. Eclampsia es la ocurrencia de convulsiones generalizadas o coma en una paciente con preeclampsia, no atribuibles a otras causas.

4.- Hipertensión crónica con Preeclampsia sobreañadida: Aparición o aumento súbito de proteinuria o hipertensión, o desarrollo de síndrome HELLP, en una mujer con hipertensión crónica

En la práctica clínica, el diagnóstico de preeclampsia se hace, cuando aparece hipertensión arterial (TA mayor o igual de 140/90) y proteinuria significativa (mayor de 300 mg en 24 horas) de forma conjunta, a partir de las 20 semanas del embarazo¹⁴.

Se han seleccionado estos dos signos clínicos: hipertensión y proteinuria por ser los más patognomónicos, es decir los más específicos para diagnosticarla; sin embargo, no siempre están presentes en el debut de la enfermedad, dando lugar a casos de presentaciones atípicas: hasta un 10-15% de gestantes que desarrollan síndrome HELLP¹⁵, y un 35% de las que presentan eclampsia no tienen hipertensión o proteinuria en el momento del diagnóstico⁸. Estas presentaciones atípicas, se deben tener muy en cuenta para no retrasar el diagnóstico con el consiguiente incremento de las complicaciones.

Se deben tener en cuenta también situaciones especiales, muy infrecuentes, como el debut antes de las 20 semanas en los casos de enfermedad trofoblástica o gestación gemelar, o hasta 4 semanas tras el parto.

En base a estas observaciones algunas sociedades científicas, como la sociedad de obstetricia de Australia y Nueva Zelanda y la sociedad de ginecología y obstetricia canadiense, han adoptado nuevos criterios para el diagnóstico de preeclampsia según los cuales no es necesario tener proteinuria significativa en orina de 24 horas, si está presente algún criterio clínico de gravedad. De esta manera no se retrasa el manejo específico del cuadro clínico, según se muestra en la tabla 2¹⁶.

Por el contrario, los criterios de diagnóstico de preeclampsia con fines de investigación, deben ser muy rigurosos, considerando siempre la definición clásica de hipertensión arterial junto a proteinuria significativa, medida en orina recolectada durante 24 horas.

II.2.2 DEFINICIONES OPERACIONALES EN PREECLAMPSIA:

Dado que la PE es una enfermedad multisistémica, con manifestaciones clínicas muy variables, existe una necesidad de unificar criterios para el ejercicio de la práctica clínica diaria y de la investigación. La gran mayoría de los autores se basan en los criterios norteamericanos del programa nacional para la educación en Hipertensión (PNEH) del Instituto Nacional del Corazón, Pulmón y Sangre, en colaboración con el Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos (ACOG)¹³.

- **Hipertensión Arterial**

El criterio más extendido para definir hipertensión es el criterio del PNEH, que considera una tensión arterial diastólica (TAD) ≥ 90 mm Hg o una tensión arterial sistólica (TAS) ≥ 140 mm Hg. Ya no se acepta como criterio de diagnóstico, el

incremento de 30 mm Hg en la TAS o 15 mm Hg en la TAD, comparada con la tensión arterial en el primer trimestre o pregestacional, por su bajo valor predictivo y alta tasa de falsos positivos. Sin embargo, la PNEH recomienda hacer un estrecho seguimiento de la evolución de estas pacientes, porque una proporción considerable de estas pacientes terminarían desarrollando preeclampsia¹³.

La OMS, en cambio considera como criterio único la TAD ≥ 90 mm Hg, ya que la tensión diastólica es el resultado directo de la vasoconstricción existente en la preeclampsia y no está influida por el gasto cardíaco.

Se debe emplear idealmente un esfigmomanómetro manual de mercurio, ya que los aparatos automatizados pueden infravalorar los resultados¹⁷.

Se requiere por lo menos dos mediciones de la TA que cumplan estos criterios, separadas por al menos 4 horas, pero por no más de una semana.

Así mismo, se deben tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

La OMS recomienda realizar la lectura de la TAD, en la cuarta fase de Korotkoff (apagamiento del ruido); a diferencia de la PNEH que propone considerar la quinta fase (desaparición del ruido) por ser la más precisa y reproducible; sin embargo, no existen una diferencia significativa entre considerar una u otra fase, en cuanto a predicción de complicaciones maternas fetales.

Se debe realizar con la gestante sentada, con los pies apoyados, durante 3 minutos, en ambos brazos, considerando la medida del brazo derecho si la diferencia es mínima.

Tabla 2. Definiciones operacionales de preeclampsia. (Tomado de Steegers EA et al)¹⁶

	RCOG (2006)	SOMANZ (2008)	SOGC (2008)	ASH (2008)
Preeclampsia (definición clínica)	Hipertensión gestacional (hipertensión inducida por la gestación) y proteinuria significativa (>0.3 g/24 h)	Hipertensión gestacional junto a: -proteinuria en tira reactiva $\geq 1+$, confirmada por Cociente Prot:Crea ≥ 30 mg/mmol o $\cdot 3$ g/24 h; -creatinina plasmática $>90 \mu\text{mol/L}$; -oliguria; -trombocitopenia; -hemólisis; -coagulación vascular diseminada; -elevación de transaminasas; - Epigastralgia o dolor en hipocondrio derecho severos; -eclampsia; -hiperreflexia con clonus sostenido; -cefalea severa; -alteraciones visuales persistentes; -ataque fulminante; edema pulmonar; -restricción del crecimiento intrauterino; -abruptio placentario	Hipertensión preexistente e hipertensión resistente, , nueva proteinuria, o condiciones adversas (vease criterios de severidad más adelante) Hipertensión gestacional y proteinuria (cociente Pr:Cr ≥ 30 mg/mmol or 0.3 g/24 h), o condiciones adversas	Hipertensión gestacional o hipertensión Crónica y proteinuria (dipstick $\geq 1+$, cociente Pr:Cr ratio ≥ 30 mg/mmol o 0.3 g/24 h)
Preeclampsia (definición en investigación)		Hipertensión de novo >20 semanas de gestación, retornando a la normalidad en el postparto, Proteinuria correctamente documentada		

RCOG=Royal College of Obstetricians and Gynaecologists.

SOMANZ=Society of Obstetric Medicine of Australia and New Zealand. SOGC=Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada.

ASH=American Society of Hypertension.

Pr:Cr=Cociente proteínas/creatinina. HELLP=hemólisis, elevación de enzimas hepáticas, plaquetopenia.

ALT=alanino transaminasa. AST=aspartato transaminasa. LDH=lactato deshidrogenasa

- **Proteinuria significativa:**

En el embarazo, se define como proteinuria significativa, a la excreción de más de 300 mg de proteínas en orina recogida durante 24 horas. Se ha establecido este punto de corte porque corresponde al percentil 99 en gestantes sanas, ya que la proteinuria se incrementa fisiológicamente en el embarazo como resultado del aumento de la filtración glomerular¹⁸.

En gestantes diabéticas y obesas estas cifras se pueden alcanzar sin que se asocien a preeclampsia; por lo que algunos autores han propuesto elevar el límite a 500 mg, en estas mujeres¹⁹.

El método más fiable para diagnosticar la proteinuria significativa es la recogida de orina de 24 horas, considerado clásicamente como el gold estándar²⁰; sin embargo no siempre es posible hacer la recolección de la muestra de forma correcta, por lo que algunos consensos aceptan la utilización de tiras reactivas junto al cociente proteínas creatinina, en muestra aislada de orina, como métodos alternativos aceptables.

Las tiras reactivas constituyen un método de despistaje muy utilizado por ser una forma fácil y barata. Es un método cualitativo, asignándose a cada nivel un valor aproximado de proteínas: 1+ correspondería a entre 30 y 100 mg/dl; 2+ entre 100 y 300 mg/dl; 3+ entre 300 y 1000 mg/dl; y 4+ a más de 1000 mg/dl. Su correlación con la proteinuria en orina de 24 horas no es muy buena, de manera que una proteinuria en toma aislada de 1+ (30-100 mg/dl) predice una proteinuria de 24 horas mayor de 300 mg, con una sensibilidad de 60-70 % y una especificidad del 80%²¹. Esto es debido a que su determinación depende de varios factores como el pH de la orina, la cantidad de sal, la presencia de infección urinaria, y sobre todo debido a que la excreción de proteínas es fluctuante, variando ampliamente a lo largo del día y de la noche.

El cociente proteínas/creatinina, ha demostrado tener una mejor correlación, como determinación rápida en muestra aislada, alcanzando una sensibilidad del 85% y una especificidad del 75%, tomado como punto de corte 30 mg/mmol²².

Todos los consensos de forma general, aceptan como criterio diagnóstico la proteinuria en orina de 24 horas mayor de 300 mg, siendo el método de elección siempre que sea posible. La SOMANZ considera la tira reactiva $\geq 1+$ únicamente como método de despistaje, teniendo que ser confirmado posteriormente con cociente proteínas/creatinina o recogida de orina de 24 horas. La ASH, aunque no lo recomienda en condiciones ideales, acepta como diagnóstico la tira reactiva $\geq 1+$ en dos ocasiones separadas por 6 horas y menos de una semana, habiendo descartado previamente una infección de vías urinarias. Ver tabla 2.

II.2.3. CLASIFICACIÓN DE LA PREECLAMPSIA

La preeclampsia se clasifica de forma clásica, de acuerdo a su gravedad, en preeclampsia leve y preeclampsia grave. Recientemente se está dando más importancia al momento de la aparición de la preeclampsia, surgiendo así la clasificación de preeclampsia precoz y preeclampsia tardía, que desarrollaremos más adelante.

II.2.3.1. Preeclampsia grave versus preeclampsia leve

Todos los consensos, coinciden en definir a la preeclampsia como grave cuando presenta algún criterio de gravedad. Dichos criterios consisten en la existencia de algún signo o síntoma de daño de órgano blanco materno, de alteración analítica o de compromiso del bienestar fetal.

Los criterios de gravedad son muy parecidos, según las diferentes sociedades, según se observa en el tabla 3.

Tabla 3. Criterios de Gravedad

	RCOG (2006)	SEGO (2007)	SOGC (2008)	ASH (2008)
HTA severa	170/110	160/110		160/110
Proteinuria masiva	1gr/litro	2 gr/día	3-5 gr/día	3 gr/día
Síntomas maternos	Cefalea intensa; alteraciones visuales ; dolor epigástrico o vómito	Cefalea; alteraciones visuales o dolor epigástrico	Cefalea persistente, inusual o de novo Alteraciones visuales; Dolor abdominal persistente o dolor en hipocondrio derecho; náuseas o vómitos graves, dolor torácico o disnea.	Cefalea; alteraciones visuales; dolor abdominal
Signos maternos de disfunción de órgano blanco	Eclampsia; hipertensión grave ; proteinuria masiva ; dolor hipocondrio; clonus; papiledema	Eclampsia; cianosis o edema pulmonar; hemorragia retiniana o papiledema.	Eclampsia; Hipertensión grave; edema pulmonar; sospecha de abruptio placentario	Hipertensión diastólica severa (≥ 110 mm Hg); Proteinuria masiva, oliguria
Alteraciones analíticas maternas	Plaquetas $<100 \times 10^9/L$, síndrome HELLP, elevación de enzimas hepáticas (ALT or AST > 70 U/L)	Creatinina sérica $> 1,2$; enzimas hepáticas elevadas; plaquetas $<100 \times 10^9/L$, anemia hemolítica microangiopática; oliguria < 500 ml/24 horas	Elevación de creatinina sérica; Incremento de AST, ALT, o LDH con síntomas asociados; plaquetas $<100 \times 10^9/L$; o albúmina sérica < 20 g/L	Elevación de creatinina sérica, Disminución de la tasa de filtración glomerular, o incremento de AST o LDH
Alteraciones del bienestar fetal	No incluido	Crecimiento intrauterino retardado	Oligohidramnios; restricción de crecimiento intrauterino; flujo diastólico ausente o reverso en doppler de arteria umbilical; muerte fetal intrauterina	Test de bienestar fetal no tranquilizadores

RCOG= Royal College of Obstetricians and Gynaecologists.

SOGC= Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada.

ASH= American Society of Hypertension.

Pr:Cr= cociente proteína/creatinina. HELLP= hemólisis, elevación de enzimas hepáticas, plaquetopenia.

ALT=alanina transaminasa AST=aspartato transaminasa. LDH=lactato deshidrogenasa

Clásicamente, se ha considerado que la existencia de uno de estos criterios incrementaría significativamente la morbilidad materna y mortalidad perinatal, por lo que el manejo médico cambia considerablemente y el momento de tomar la decisión de terminar la gestación se adelanta.

Sin embargo, el estudio PIERS (Preeclampsia Integrated Estimate of Risk), que comparó los criterios de severidad de las sociedades americana y canadiense, concluyó que los criterios clásicos utilizados como: aparición de cefalea, alteraciones visuales, dolor epigástrico, TAS ≥ 160 mm Hg o proteinuria intensa en tira de orina no se asocian de forma significativa con aumento de la morbilidad materna y fetal. Por su parte, los criterios de TAD ≥ 110 mm Hg, disnea, síndrome de HELLP y sospecha de abruptio; sí se relacionan con un mayor número de eventos adversos maternos²³.

II.2.3.2. Preeclampsia precoz versus preeclampsia tardía

Está demostrado que la preeclampsia grave aumenta la mortalidad (0,2%) y morbilidad materna (5%) debido a insuficiencia renal, fallo hepático, hemorragia hepática, coagulopatía intravascular diseminada, convulsiones e ictus; y triplica el riesgo de CIR, abruptio placentario y muerte perinatal, respecto a la preeclampsia leve. Sin embargo, como se ha visto anteriormente, parece ser que algunos de los criterios de severidad utilizados no determinan un peor resultado materno y fetal.

En los últimos años se ha prestado especial interés al momento del debut de la preeclampsia, debido a que se ha observado un comportamiento diferente de la enfermedad según la edad gestacional a la que se diagnostica. La preeclampsia que se presenta a término tiene una morbilidad y mortalidad similar a una gestante normotensa; excepto en los casos de síndrome HELLP²⁴.

La preeclampsia que aparece antes de las 32 semanas tiene una mortalidad materna 20 veces mayor que la preeclampsia a término. Además, existe también una

buena correlación entre precocidad y severidad; así el 95% de las preeclampsias leves se presentan tardíamente y por el contrario, hasta la mitad de las preeclampsias graves lo hacen de forma precoz²⁵.

En base a estas observaciones, se ha planteado clasificar a la preeclampsia, en preeclampsia de aparición precoz y preeclampsia de aparición tardía, considerándolas como dos entidades distintas ya que tienen diferencias importantes en cuanto a factores de riesgo, manifestaciones clínicas, etiopatogenia, herencia, factores predictivos y pronóstico (Tabla 4). No se ha llegado todavía a un consenso sobre cual debe ser la edad gestacional que se debería usar como punto de corte; pero la tendencia actual de los investigadores es utilizar la semana 34 de gestación²⁶.

Si bien ambas entidades comparten factores de riesgo comunes, varios estudios coinciden en demostrar que la preeclampsia precoz tiene una mayor asociación con preeclampsia en gestación previa, primigestación, raza negra, uso de inductores de la ovulación y, tiene como factor protector, el tabaquismo. La preeclampsia tardía por su parte, se asocia más con historia familiar de preeclampsia, edad materna menor de 20 años o mayor de 40 años, multiparidad, obesidad, mayor ganancia de peso durante la gestación, diabetes gestacional, anemia materna y tabaquismo^{27,28}.

En cuanto a su etiopatogenia, las gestaciones afectadas por preeclampsia precoz presentan con gran frecuencia signos de hipoperfusión placentaria, encontrándose una relación inversa entre la edad gestacional de presentación, y la frecuencia de lesiones placentarias²⁹; aumentando la correlación si la preeclampsia precoz se asocia a CIR^{30,31}.

En contraste, en la preeclampsia tardía se encuentran menos lesiones placentarias asociadas a hipoxia con tamaños placentarios que suelen ser normales o mayores a los normales³².

Tabla 4. Comparación de preeclampsia precoz y tardía

	PREECLAMPSIA DE APARICIÓN PRECOZ	PREECLAMPSIA DE APARICIÓN TARDÍA
Severidad	Más severo: HELLP, eclampsia	Menor asociación
Crecimiento fetal	Mayor asociación a RCIU	a 80% Frecuentemente fetos adecuados o grandes para edad gestacional
Signos de hipoxia placentaria	Muy frecuentes	Poco frecuentes
Tamaño placentario	Pequeño	Adecuado o grande
Doppler de arteria uterina en primer y segundo trimestres	Alterado (IP por encima de percentil 95)	Habitualmente normal
Balance angiogénico	sFlt-1 muy elevado PIGF/sEng disminuida sFlt-1/PIGF muy elevada	sFlt-1 ligeramente elevada PIGF/sEng levemente disminuida sFlt-1/PIGF ligeramente elevada
Predicción	Buenos resultados en el primer y segundo trimestre	Pobres resultados en todos los trimestres

Además, cuando se ha estudiado la perfusión placentaria, en base a estudio doppler, se ha demostrado que la preeclampsia precoz presenta una disminución significativa respecto de la preeclampsia tardía, que tuvo una perfusión mayor o igual a la encontrada en gestaciones normales³³.

Todo esto apoya la importancia de la hipoperfusión placentaria en la génesis de la preeclampsia precoz ; en cambio, en la preeclampsia tardía parece no cumplir un rol tan trascendental³⁴.

Actualmente se sabe que el receptor soluble del factor de crecimiento vascular endotelial (sFlt-1), es el principal factor antiangiogénico, que ocupa un papel central como mediador de la disfunción endotelial en la preeclampsia. La producción de sFlt-1 está estimulada por la hipoxia placentaria a través de la expresión del HIF-1 (*Factor inducible por hipoxia*)³⁵; encontrándose niveles significativamente más altos en la preeclampsia precoz^{30,31}.

Wikstrom et al, encuentra elevación en 43 veces de los niveles de sFlt-1 en la preeclampsia precoz y de solo 3 veces en la PE tardía, con respecto a controles sanos³⁶. Recientemente, Tobinaga et al hallaron diferencias significativas en los niveles de sFlt-1 y de otro factor antiangiogénico importante, la endoglina soluble (sEng), más altos en la preeclampsia precoz, respecto de la preeclampsia tardía³⁷.

El grado de desequilibrio angiogénico más marcado en la preeclampsia precoz, junto a la influencia de la predisposición genética y los factores ambientales, determinaría también las diferencias en las manifestaciones clínicas materno- fetales más graves en los casos de preeclampsia precoz³⁸.

II.3. FISIOPATOLOGÍA Y ETIOLOGÍA MULTIFACTORIAL DE LA PREECLAMPSIA

La etiología primaria de la preeclampsia continúa siendo una incógnita para la obstetricia moderna. Se considera un síndrome de etiología multifactorial, con claro origen localizado en la placenta, de acuerdo con las siguientes observaciones clínicas: la preeclampsia es exclusiva de las gestaciones humanas, siendo condición indispensable que exista placenta; no siendo necesario la presencia de feto, como en el caso de las gestaciones molares, ni siquiera del útero, ya que se han descrito la existencia de preeclampsia en gestaciones ectópicas abdominales. En el caso de las

gestaciones molares y gemelares, que son claros factores de riesgo para desarrollar preeclampsia, existe un incremento de la masa placentaria respecto a la cantidad de flujo sanguíneo. La expulsión de la placenta tras el parto se asocia, de forma general, con la remisión del cuadro clínico de preeclampsia⁸.

Los estudios experimentales actuales, han podido esclarecer que las alteraciones primarias de la preeclampsia, ocurre tempranamente en el desarrollo de la circulación uteroplacentaria, dando lugar a una insuficiencia e isquemia placentarias³⁹.

Sin embargo se necesita además que intervengan otros factores de riesgo maternos, que condiciona una mayor predisposición a disfunción endotelial sistémica como son la hipertensión arterial crónica, diabetes mellitus, obesidad, lupus eritematoso sistémico o trombofilias.

De acuerdo a estas consideraciones, actualmente la fisiopatología de la preeclampsia se explica como un proceso dividido en dos etapas bien diferenciadas: la primera, una placentación anormal que da lugar a una deficiente circulación placentaria y la segunda en una disfunción endotelial materna sistémica.

II.3.1. Anomalías en el proceso de la placentación

La placenta humana, está conformada por un conjunto de vellosidades, que en su interior contienen capilares fetales, que son bañados por sangre materna. Funciona como una barrera hemocorioendotelial a través de la cual se produce el intercambio de gases y sustancias entre la madre y el feto. El intercambio de gases, fundamentalmente oxígeno y CO₂, depende de la adecuada angiogénesis placentaria, que es un proceso continuo durante toda la gestación; y de la cantidad de sangre que llega a la zona de intercambio (espacio vellosa) traída por las arterias espirales.

Las arterias espirales, que son los vasos sanguíneos terminales del árbol vascular uterino, se encuentran en la parte más interna del miometrio, y atraviesan la decidua para aportar el flujo sanguíneo al espacio intervelloso. Estas arterias sufren una modificación durante el desarrollo placentario, para poder cubrir las necesidades nutricionales del feto; sufriendo la invasión de las células trofoblásticas que destruyen la capa muscular lisa, dilatando los vasos y aumentando significativamente el flujo sanguíneo. Ocurre a través de dos oleadas sucesivas de invasión trofoblástica, en la primera mitad del embarazo. En la preeclampsia dicho proceso ocurre de forma superficial e insuficiente, ocasionando una inadecuada perfusión sanguínea placentaria. Se acepta actualmente que esta hipoxia placentaria puede causar la liberación de factores nocivos para el endotelio materno y para la propia angiogénesis placentaria.

II.3.1.1. Oleadas de invasión trofoblástica:

La primera oleada de invasión trofoblástica, que ocurre entre la sexta y duodécima semana, está limitada sobre todo a la porción decidual y a la unión miometrial (tercio interno del miometrio). Al inicio se produce una invasión intraluminal de las células del citotrofoblasto que forman taponamientos y evitan que se establezca una verdadera circulación materno placentaria, hasta la semana 10-12.

Esto concuerda con la teoría de la *hipoxia del periodo embrionario*, según la cual entre la semana séptima y décima la presión parcial de oxígeno (PO₂) placentaria es menor a 20 mmHg, para favorecer la diferenciación celular y evitar los efectos dañinos de los radicales libres de oxígeno sobre la organogénesis⁴⁰. Con la apertura de las boquillas vasculares de las arterias espirales entre las semana 11 y 14, la PO₂ subiría a 50 mmHg.

La segunda oleada se desarrolla entre la semana 14 y 20, consistente en la invasión endovascular de las arterias espirales a nivel del tercio interno del miometrio, favorecida por la ruptura de los taponamientos que permite que las células del citotrofoblasto migren hacia la porción miometrial⁴¹.

Entre la semana 16 y 20 se ha completado dicho proceso de revestimiento de las arterias espirales en la porción decidual y miometrial, por células de citotrofoblasto, teniendo como resultado unos vasos sanguíneos de mayor calibre y menor resistencia, que permiten un mayor flujo sanguíneo, adecuado a las necesidades de nutrientes del feto⁴².

A partir de la semana 20, en la placenta continúan los procesos de angiogénesis y remodelado vascular, mediados por factores de crecimiento, para el mantenimiento de la necesidades fetales que se incrementan de forma exponencial en el tercer trimestre, llegando a formarse las vellosidades terminales que alcanzan una superficie de intercambio de 12 a 14 m² al final del embarazo⁴³.

II.3.1.2. Fallo de la invasión trofoblástica y establecimiento de una deficiente circulación placentaria

Se sabe, desde hace mucho tiempo, que la invasión trofoblástica en la preeclampsia resulta insuficiente y superficial, limitándose a la decidua proximal, sin que ocurra la dilatación vascular en la porción miometrial, produciéndose una circulación de alta resistencia y bajo flujo, y por lo tanto una hipoxia placentaria relativa. Este fallo en la invasión trofoblástica, sin embargo, no es exclusivo de la preeclampsia, observándose también en el CIR, e incluso en embarazos normales⁴⁴.

Todavía no se conoce el mecanismo de esta anomalía, que ocurre muy tempranamente en el embarazo, habiéndose postulado para ello varias teorías. Se piensa que podría deberse a un *defecto en la decidualización*, que dificulte la adecuada

invasión trofoblástica. También se cree que podría *fallar la disolución de los taponamientos*, impidiendo la migración de las células del citotrofoblasto a las porciones miometriales de las arterias espirales en la segunda oleada de invasión trofoblástica, lo que provocaría una persistencia del estado de hipoxia relativa y de la expresión del factor inducible por hipoxia (HIF 1 α), impidiendo la diferenciación de citotrofoblasto a sus fenotipos invasivos⁴⁵. Finalmente se cree que podría ser el resultado de una *mala adaptación inmunológica materna al tejido trofoblástico*, impidiendo que el trofoblasto que expresa antígenos paternos, invada la parte materna decidual y miometrial. Se conoce que el citotrofoblasto invasor no expresa los complejos de histocompatibilidad más polimórficos como el HLA 1 y HLA B; expresando sólo el HLA G, a través del cual interacciona con las células natural killer (NK), inactivando sus funciones citotóxicas y promoviendo que expresen factores de crecimiento y factores angiogénicos para la remodelación de las arterias espirales. En los casos de preeclampsia se ha observado que la expresión de HLA G está reducida, produciéndose un aumento de las citoquinas citotóxicas por las células NK y los macrófagos situados en la decidua, y un incremento de los fenómenos apoptóticos que incrementan la liberación de detritus trofoblásticos a la circulación materna⁴⁶.

II.3.2. Disfunción endotelial materna sistémica. Factores angiogénicos y antiangiogénicos.

Las consecuencias de las alteraciones de la placentación ocurridos tempranamente, se manifiestan más tardíamente en el embarazo, cuando las necesidades fetales superan a la capacidad placentaria, y producen una hipoxia progresiva liberándose a la circulación materna una serie de factores solubles tóxicos para el endotelio, responsables de la disfunción endotelial materna. En la última década se ha determinado que los factores antiangiogénicos, son los mediadores más importantes de la disfunción endotelial materna causante de la preeclampsia^{47,48}.

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), es el principal factor angiogénico inducido por hipoxia, regulador de la proliferación celular endotelial, que juega un papel importante en la vasculogénesis y la permeabilidad vascular sistémica.⁴⁹

El VEGF es producido durante el proceso de placentación, iniciando la vasculogénesis (formación de novo del sistema circulatorio embrionario) y la angiogénesis (crecimiento de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes) en coordinación con otros factores angiogénicos como el factor de crecimiento placentario (PIGF)⁵⁰.

El VEGF y sus receptores pueden desempeñar un papel fundamental en la fisiopatología de la PE.⁵¹ Varios grupos han demostrado que las concentraciones circulantes de VEGF totales están elevadas en mujeres con preeclampsia⁵²⁻⁵⁴. Las concentraciones de VEGF libre (no unida al receptor) se han encontrado significativamente bajas⁵⁵. Esto se explica debido a los altos niveles circulantes de receptor soluble sflt-1 que capta al VEGF circulante, disminuyendo significativamente su fracción libre, que es la forma activa responsable de sus acciones fisiológicas⁵⁶.

El VEGF resulta fundamental, sobre todo para el correcto funcionamiento de los endotelios fenestrados de los glomérulos renales, cerebro e hígado, que son los órganos diana que más se pueden comprometer en la preeclampsia. Por otra parte, se ha demostrado experimentalmente, que los ratones que carecen de un alelo del gen del VEGF en los podocitos renales, desarrollan la patología renal típica que se encuentra en las mujeres embarazadas con preeclampsia, que constituye una prueba adicional del papel VEGF en la enfermedad renal durante preeclampsia⁵⁷.

En la preeclampsia, la hipoxia placentaria produce una alteración en la expresión de ligandos y receptores de la familia del VEGF, resultando en un desequilibrio entre los factores angiogénicos y antiangiogénicos⁵⁸.

El receptor soluble del factor de crecimiento vascular endotelial (sFlt-1), es el principal factor placentario inducido por la hipoxia crónica, y actúa como un potente factor antiangiogénico, al circular libremente y unirse al VEGF, bloqueando sus efectos y ocasionando así la disfunción endotelial sistémica de la preeclampsia⁵⁹.

Dado que las pacientes con predisposición a tener preeclampsia, muestran un aumento de las concentraciones de VEGF, algunas semanas antes de su debut clínico, se ha postulado que el VEGF actúa como elemento causal en la patogénesis de preeclampsia, en lugar de ser una consecuencia de ésta^{54,60}.

El sistema de VEGF está regulado positivamente, a nivel transcripcional y traduccional en respuesta a la hipoxia placentaria crónica, que es un fenómeno central en la patogénesis de la preeclampsia⁶¹.

II.4. BASE GENÉTICA DE LA PREECLAMPSIA

Después de más de un siglo de intensa investigación, el origen primario de la preeclampsia sigue siendo un enigma. La hipótesis de que la causa de la preeclampsia es al menos en parte genética, está ampliamente sugerida por su concurrencia en espacio y tiempo, en el curso de la historia. El primer registro de eclampsia ha sido encontrado en el papiro de Kahun, hace 3000 años⁶².

Los datos sobre su incidencia por parto, en Europa durante el siglo XVIII y XIX, principalmente en Francia y Alemania, han sido registrados por Chesley⁶³. Davies ha incluido 741 artículos sobre la distribución geográfica de la ocurrencia de preeclampsia que publicó hasta 1971⁶⁴. Estas dos recopilaciones masivas de casos, corroboran que la preeclampsia, puede ocurrir bajo las más diversas condiciones ambientales; por lo tanto, es inverosímil la existencia de una causa puramente ambiental.

Descifrar la susceptibilidad genética de la preeclampsia, es un reto difícil, sobre todo porque la enfermedad se expresa sólo en mujeres que han tenido hijos. Por otro lado en los trastornos del embarazo, es necesario tener en cuenta dos genotipos, el de la madre y el del feto, es decir los genes heredados del padre y de la madre. Los genes maternos y paternos pueden tener efectos independientes o interactivos en el riesgo de preeclampsia. Por último la gran heterogeneidad en la gravedad de la preeclampsia, que en algunos estudios se sobreponen casos de HTA gestacional sin proteinuria.

Diferentes enfoques se han utilizado para determinar la contribución relativa de los factores genéticos y ambientales en la preeclampsia, entre los más destacados figuran los siguientes: estudios en gemelos, determinación de la susceptibilidad a preeclampsia en función del genotipo materno y paterno, pantallas de mapeo genético, genes candidatos posicionales, mapeo de asociación amplia del genoma y enfoque de genes candidatos basados en la fisiopatología.

II.4.1. Estudios en gemelos.

Los estudios en gemelos ayudan a distinguir entre las influencias genéticas y ambientales sobre rasgos y comportamientos individuales.

Se han llevado a cabo dos grandes estudios de gemelos en preeclampsia, con resultados dispares. El primer estudio realizado en Suecia con 917 pares de gemelos monocigóticos y 1.199 pares de gemelos dicigóticos, dio como resultado estimaciones de la heredabilidad, y del efecto ambiental no compartido de 0,54⁶⁵.

Por otro lado, un estudio australiano de cohortes, en un total de 2.362 pares de mujeres gemelas, incluyendo solamente los casos de PE más severos no encontró ningún par de gemelas concordantes afectadas⁶⁶.

Para el ajuste de posibles contribuciones genéticas o ambientales inducidas por los padres, se analizaron los resultados relacionados a embarazos de familias suecas, utilizando el registro nacional de nacimientos, durante un período de 11 años. Se obtuvo información de 244.564 pares de hermanos, con un total 701.488 embarazos. Se informó que el 35% del riesgo de preeclampsia era atribuible a los efectos genéticos maternos, 20% a los efectos genéticos fetales (con igual contribución genética materna y paterna), el 13% ligado a una pareja específica, que sería la misma en todos los embarazos sucesivos de la misma mujer, 1% para el ambiente compartido por los hermanos y 32% a factores indeterminados⁶⁷.

En conclusión, muchos estudios reportan que la contribución genética al desarrollo de preeclampsia está alrededor del 50 %, lo que significa que interacciones genéticas y ambientales juegan un rol importante.

Para un pequeño número de familias, la preeclampsia parece seguir los patrones mendelianos de herencia, consistente en una variante monogenética rara o una mutación deletérea con alta penetrancia. Para la mayoría de la población, sin embargo, parece representar un trastorno genético complejo, y se produce como numerosas variantes comunes en diferentes loci, que de forma individual tienen pocos efectos pero que colectivamente pueden ser causa de susceptibilidad de un individuo a la enfermedad. Las exposiciones ambientales, como la edad y el peso, también determinan si estas variantes genéticas de baja penetrancia resultan en la manifestación fenotípica de la enfermedad. Es probable que ninguna variante genética única sea responsable de todos los casos de preeclampsia, pero es posible que diferentes variantes se asocien con varios subconjuntos de la enfermedad (por ejemplo preeclampsia asociada a CIR).

II.4.2. Determinación de la susceptibilidad a la preeclampsia en función del genotipo materno y paterno

Parece clara la necesidad de evaluar tanto al genotipo materno como fetal. El papel central de la placenta en la patogénesis de la enfermedad también indica la contribución genética fetal. Reportes de casos de preeclampsia severa de comienzo muy precoz en el embarazo, en pacientes con anomalías cromosómicas fetales como la mola hidatiforme; señalan el papel de los genes heredados del padre como responsables del fenotipo clínico. Esta observación está apoyada por estudios epidemiológicos que reportan una mayor tasa de preeclampsia en embarazos de padres que a su vez nacieron de embarazos con preeclampsia⁶⁸.

La ocurrencia de la enfermedad en hijas políticas de madres con preeclampsia apoya también la contribución de ambos padres⁶⁹.

Una hipótesis de conflicto genético propone que los genes fetales de origen paterno serán seleccionados para aumentar la transferencia de nutrientes al feto; mientras los genes maternos serán seleccionados para limitar la transferencia de nutrientes en exceso, estableciendo un equilibrio óptimo⁷⁰.

Por lo tanto, los genes paternos aumentarían la tensión arterial materna con el fin de mejorar el flujo sanguíneo útero placentario, mientras que los genes maternos actuarían de manera opuesta. La disfunción endotelial en madres con preeclampsia sería interpretada entonces como un intento del feto para compensar un aporte de nutrientes inadecuado.

Debido a que el fenotipo sólo es expresado durante el embarazo, la identificación de los hombres susceptibles no es posible. El estudio colaborativo de Genética de la preeclampsia (GOPEC) realizado en familias de Reino Unido, destacó la necesidad de incluir en el análisis a todos los genotipos intervinientes, y llevar a cabo el estudio de desequilibrio de transmisión en tríadas materno paterno y fetales⁷¹.

Entender la contribución del genotipo materno y fetal requerirá de grandes tamaños de muestra y el desarrollo de algoritmos para entender la contribución relativa de la madre y el feto.

II.4.3. Pantallas de mapeo genético

El genoma humano consiste en 25.000 genes, incluyendo una proporción significativa de función desconocida. Con el advenimiento de las técnicas de microarrays, la detección de todo el genoma humano ahora es posible.

El cribado de todo el genoma es un enfoque agnóstico, que al no estar limitado por el conocimiento biológico funcional aceptado, puede ofrecer nuevos conocimientos sobre el proceso de la enfermedad.

Las pantallas de mapeo genético (PMG), han tenido mucho éxito para la identificación de las variantes genéticas de alta penetrancia en enfermedades monogénicas, pero este método tiene un poder limitado para identificar genes con pequeño efecto en desórdenes genéticos complejos. En la preeclampsia la falta de un fenotipo reconocible en los hombres o en las mujeres que no han tenido hijos, y la incertidumbre del modo de herencia han hecho que sea difícil hacer análisis de ligamiento (heredabilidad) convencionales.

El estudio con PMG en pacientes con preeclampsia ha revelado una importante vinculación en los cromosomas 2p13⁷², 2p25 y 9p13⁷³. Dicha vinculación ha sido también localizada en otros loci de cromosomas 2q, 9p, 10q, 11q y 22q⁷⁴. Lamentablemente, no se han podido confirmar estos hallazgos en otros estudios.

Las posibles explicaciones incluyen las variaciones de cada población y las diferencias en la densidad de microsatélites del grupo marcador, pero el factor más importante en el fracaso para replicar los resultados es el limitado poder estadístico.

II.4.4. Genes candidatos posicionales

Receptor de Activina A tipo IIA

Las asociaciones entre genes candidatos posicionales en el locus 2q22-2, identificados con PMG han sido analizados por grupos de Noruega, Australia y Nueva Zelanda. El receptor de Activina tipo IIA (RACV2A) fue identificado como un fuerte candidato posicional en este locus. RACV2A es un receptor clave para la señalización celular de la proteína Activina A, un regulador importante del embarazo humano. Los niveles de activina circulante se incrementan en pacientes con preeclampsia, lo que sugiere su uso como potencial biomarcador significativo en preeclampsia⁷⁵.

Asociaciones significativas con preeclampsia fueron encontradas para cuatro polimorfismos de RACV2A en un estudio de más de 1.100 mujeres con PE y 2.200 controles normotensos⁷⁶.

La influencia que estas cuatro variantes tienen sobre la expresión o función de RACV2A está en investigación. Sin embargo esta asociación no fue confirmada en un estudio de 74 familias afectadas de Australia y Nueva Zelanda⁷⁷.

Debido a la fuerte implicación biológica de la Activina A en el establecimiento de embarazo, este gen sigue siendo una prioridad para futuros trabajos con adecuado poder estadístico.

ROCK2

El gen que codifica la protein kinasa 2 colieg-coil asociada a Rho, se encuentra ubicado en el cromosoma 2p25 identificado en un estudio de ligamiento con PMG, en familias finlandesas.⁷³ Este gen está implicado en la hipertensión arterial. ROCK2 se expresa ampliamente en las células musculares lisas, y se ha sugerido un papel en la vasoconstricción, confirmado en una serie de modelos animales^{78,79}.

Además ROCK2 se expresa por las células de sincitiotrofoblasto de la placenta, y se dice que la expresión es regulada positivamente en la preeclampsia⁸⁰.

El grupo finlandés comparó 10 polimorfismos de ROCK2 en 340 casos y controles; pero no encontró ninguna asociación entre estas variantes y PE. Un estudio con más poder estadístico es necesario antes de descartar ROCK2 como un gen de susceptibilidad para preeclampsia. Los resultados previos en el estudio con PMG en familias finlandesas, sin embargo sugiere un efecto genético importante, posiblemente debido a otros genes en el locus 2p25.

II.4.5. Mapeo de asociación amplia del genoma.

El mapeo de asociación amplia del genoma (MAAG), hace uso de los polimorfismos de un único nucleótido (SNP: Single Nucleotide Polymorphism). Los SNP como su nombre lo indica son polimorfismos que implican un cambio en una sola base. Estos son comúnmente bialélicos (dos posibles alelos), y tienen lugar dentro de la región codificante de los genes, y más frecuentemente en las regiones no codificantes. Más de 10 millones de SNP comunes se han identificado en el genoma humano. En teoría cualquiera de éstos, pueden afectar la función o la expresión del gen, influyendo en la susceptibilidad a la enfermedad. El genotipado de todos los 10 millones de SNP no sólo requeriría mucho tiempo, sino que sería prohibitivamente caro con la tecnología actual. El MAAG se realizan generalmente, en tres fases: 1) se genotipifican individualmente alrededor de 250.000 SNP en cientos de miles de individuos, 2) se validan los SNP que demuestran ser más significativos (decenas a miles de SNP) por genotipificado en nuevas cohortes y por último 3) se realiza el mapeo fino de los SNP adyacentes a los SNP validados (generalmente sólo unas pocas regiones).

Esta técnica permite un *screening* extenso y de alta densidad del genoma completo en busca de sitios de significativa asociación con el fenotipo estudiado.

Aunque MAAG ofrece una nueva forma para identificar variantes de susceptibilidad genética en trastornos complejos, se deben cumplir una serie de condiciones para que los resultados sean de valor. La Odds Ratio de la enfermedad

conferida por un único SNP es generalmente baja por lo que se requieren de grandes tamaños de muestras. Dos mil casos se consideran como el mínimo número para MAAG.

Estudios de MAAG para la identificación de variantes de susceptibilidad genética asociadas a preeclampsia, están en marcha en algunos centros, y sus resultados se aguardan con interés.

II.4.6. Enfoque de genes candidatos basados en la fisiopatología

Este enfoque ha sido ampliamente utilizado en la preeclampsia y en gran parte se centra en el estudio de genes maternos.

En este método un gen es elegido como candidato en base a los conocimientos biológicos previos de la fisiopatología de la preeclampsia. La elección se fortalece si el gen se encuentra dentro de una región identificada por los estudios de ligamiento.

Más de 70 genes candidatos han sido evaluados, involucrados en diversos procesos fisiopatológicos incluyendo: proteínas vasoactivas, factores angiogénicos, metabolismo lipídico, trombofilia, estrés oxidativo, lesión endotelial e inmunogenética.

Nuestro estudio se centra en el estudio de los polimorfismos del gen del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), y del gen del precursor del péptido natriurético tipo B (NPPB); ambos implicados en la fisiopatología de la preeclampsia, como veremos más adelante.

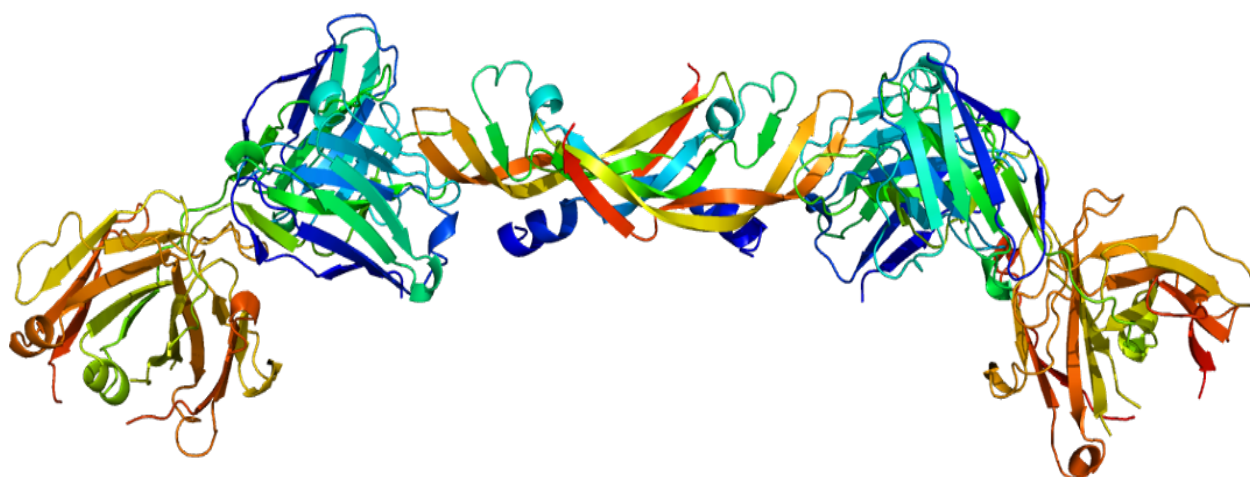
II.5. ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL CON LA PREECLAMPSIA

II.5.1. Factores angiogénicos y antiangiogénicos en la preeclampsia: papel del factor de crecimiento vascular endotelial

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), es una glicoproteína homodimérica de 34-46 kDa, implicada en la vasculogénesis y angiogénesis; que lo convierte en el mayor factor angiogénico y regulador potencial de la proliferación celular endotelial, y de la permeabilidad vascular⁸¹. Ver figura 1.

Durante el embarazo, el VEGF es esencial para la proliferación del trofoblasto, el desarrollo de la vasculatura embrionaria, y el crecimiento de las células sanguíneas maternas y fetales en el útero^{50,82}.

Figura 1. Estructura de la proteína VEGFA mediante cristalografía de rayos-X. Tomado de protein data bank



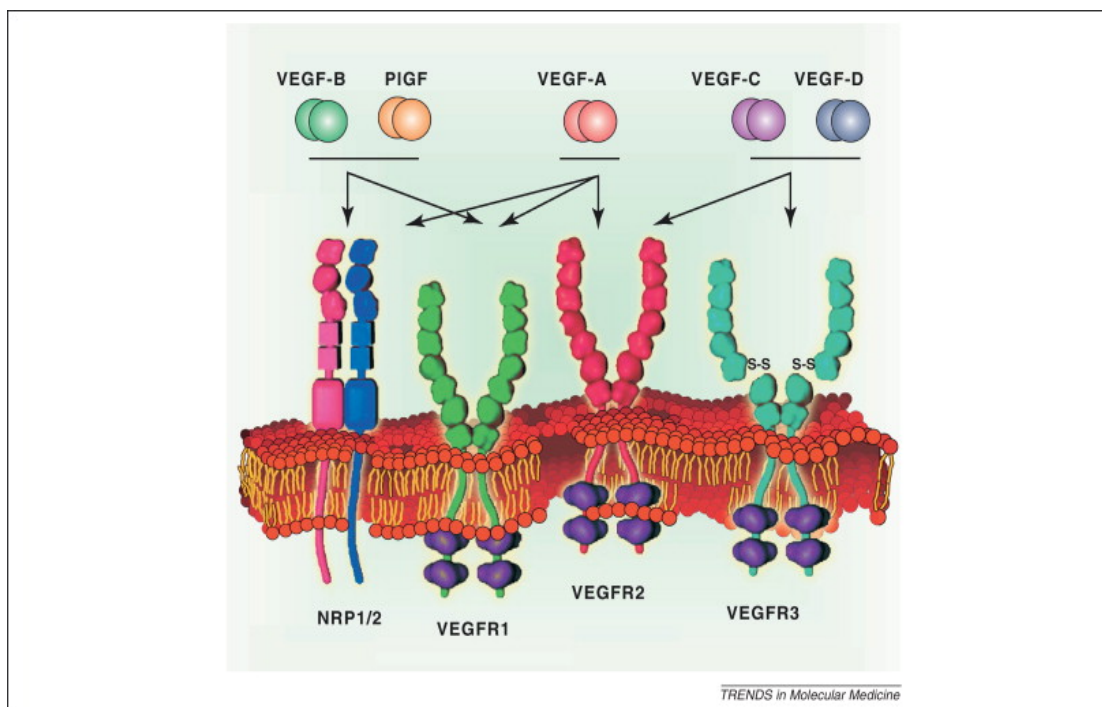
El gen humano del VEGF está localizado en el cromosoma 6 banda p21.3, consistente en 8 exones y 7 intrones, que mediante splicing alternativo (corte y empalme) del ARN mensajero, da lugar a varias proteínas angiogénicas similares, que constituyen la familia VEGF⁸³.

La familia VEGF está conformada por VEGF-A (que es la que se designa normalmente al hablar de VEGF) y 5 miembros más: VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, y el factor de crecimiento placentario (PIGF). Dichas proteínas comparten una estructura molecular típica, pero tienen diferente actividad biológica como resultado de su distinta afinidad a sus receptores VEGF conocidos.

Su actividad biológica la realiza al unirse a sus tres receptores principales de membrana de las células endoteliales de tipo tirosin kinasa, que son: el Flt-1 (VEGFR1), el KDR (VEGFR2), y el Flt-4 (VEGFR3). También se han identificado dos proteínas: neuroepitelina 1 y 2 (NRP1 y NRP2) en las células endoteliales como coreceptores para VEGF⁸⁴⁻⁸⁶. Ver figura 2

La expresión ARNm del VEGF es inducida de forma rápida y reversible por hipoxia, tanto “in vivo” como “in vitro”⁸⁷. Su expresión está incrementada en situaciones tanto fisiológicas como patológicas, donde se requiera de un incremento de la angiogénesis⁸⁸. En la placenta, el VEGF es inducido por hipoxia, iniciando la vasculogénesis en coordinación con otros factores angiogénicos⁵⁰.

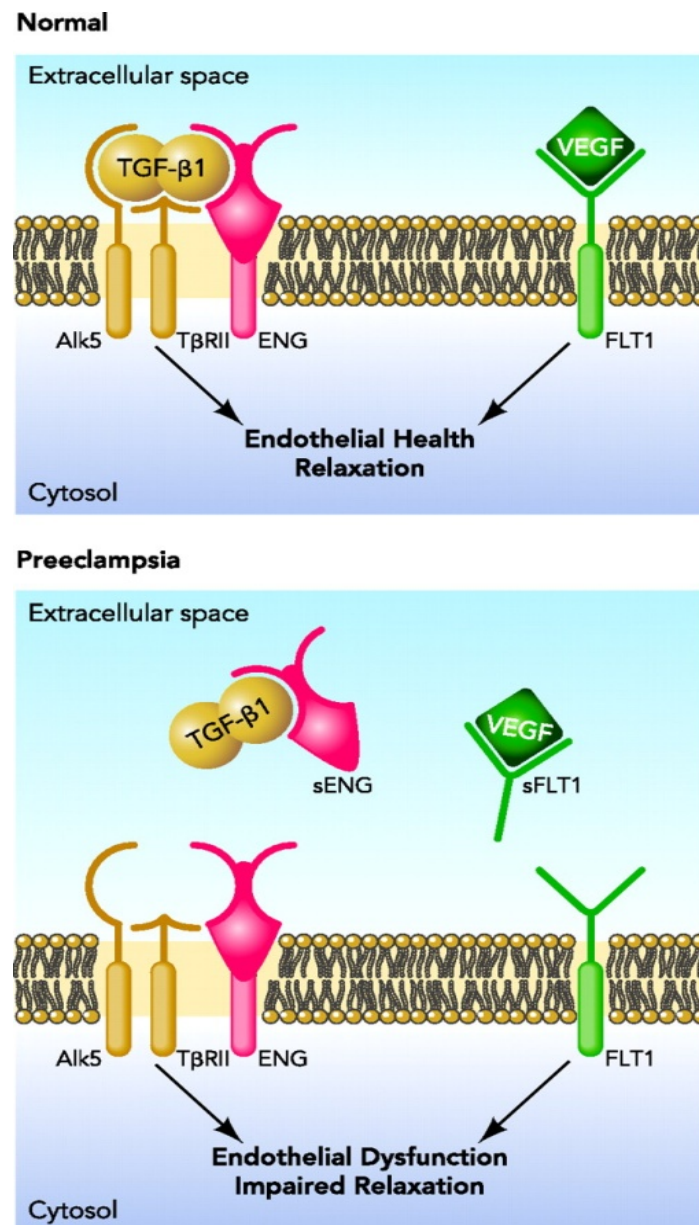
En la preeclampsia existe una alteración en la expresión de ligandos y receptores de la familia VEGF por el citotrofoblasto. Se produce un incremento del Flt-1 soluble, el cual es una variante del receptor que no está unido a la membrana celular y circula libremente capturando VEGF, lo que impide su unión a sus receptores celulares y por lo tanto disminuye sus acciones fisiológicas. (Figura 3)⁸⁹⁻⁹³

Figura 2. Esquema de la familia VEGF y sus receptores (Li X et al 2012)⁸⁶

Además el VEGF, cumple importantes funciones en el mantenimiento de la integridad del endotelio en muchos de los órganos afectados por la preeclampsia, ya que modula el tono vascular, suprimiendo la apoptosis endotelial e inhibiendo la adhesión leucocitaria y la agregación plaquetaria⁹⁴.

La importancia del VEGF en el desarrollo del embarazo normal, así como su expresión alterada en la preeclampsia; justifica la idea de que las variaciones genotípicas en el gen que codifica esta proteína, podrían afectar la susceptibilidad individual para el desarrollo de esta enfermedad, en combinación con los factores ambientales.

Figura 3. Esquema de la acción antagonista del sFLT-1 sobre la función del VEGF en la preeclampsia (Tomado de Wang A, et al) ⁸⁹

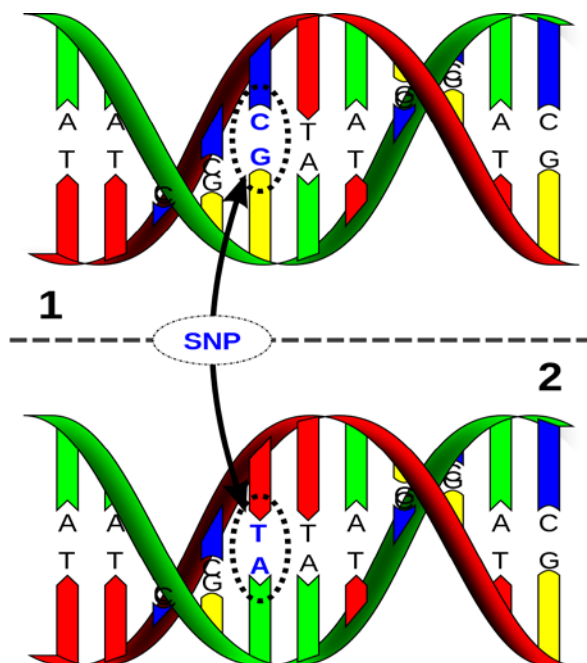


II.5.2. Polimorfismos genéticos del gen del factor de crecimiento vascular endotelial asociados a preeclampsia

Los polimorfismos genéticos son variantes del genoma, que aparecen por mutaciones en algunos individuos, se transmiten a la descendencia y pueden adquirir cierta frecuencia en la población tras múltiples generaciones. Los polimorfismos son la base de la evolución y los que se consolidan, bien pueden ser silentes, pueden proporcionar ventajas a los individuos, o también pueden contribuir a causar enfermedades.

Los polimorfismos más frecuentes son cambios de una única base. A éstos se les denomina polimorfismos de un único nucleótido. Los SNP son considerados como una forma de mutación puntual que se ha fijado en una parte significativa de la población de una especie. Los SNP no cambian mucho de una generación a otra, y por ello es sencillo seguir su evolución en estudios de poblaciones. Por ello, son marcadores genéticos de gran utilidad en investigación médica y otras pruebas genéticas como detección de genes de resistencia, identificación individual, asignación racial, o predisposición a determinadas enfermedades. Los SNP forman hasta el 90% de todas las variaciones genómicas y aparecen cada 100 a 300 bases en promedio, a lo largo del genoma humano.

Se han descrito varios polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) que afectan la expresión del gen que codifica la familia de proteínas VEGF. Algunos de estos polimorfismos, -2578C/A, -1154G/A, y -634G/C en la región promotora, y +936C/T en la región 3' no traducida, presentan asociación con las variaciones en la síntesis proteica del VEGF^{95,96}.

Figura 4. Esquema de un polimorfismo de un único nucleótido

Los genotipos -2578C/A, -1154G/G y -634G/C parecen estar asociados a una mayor expresión de VEGF^{97,98}. Mientras que el alelo +936 T se correlaciona con una menor expresión de VEGF⁹⁶. También se ha reportado, que el alelo -2578 A, predispone a una disminución de la capacidad de producción proteica de VEGF⁹⁹.

La relación entre estos polimorfismos y la susceptibilidad genética que pueden conferir para el desarrollo de PE, ha sido motivo de investigación en los últimos años; con resultados heterogéneos y discrepantes entre los diferentes estudios.

Papazoglou et al, estudiaron los tres polimorfismos frecuentes: -2578C/A, -634G/C y +936C/T en una población griega, sin encontrar asociación entre los genotipos estudiados y la preeclampsia. Sólo encontraron correlación entre el polimorfismo +936C/T y la severidad de la enfermedad, siendo significativamente más frecuente el alelo T en las pacientes que desarrollaron preeclampsia grave¹⁰⁰.

Resultados similares fueron reportados por Shim et al en mujeres coreanas, quienes encontraron que el alelo +936 T fue significativamente más frecuente en los pacientes con preeclampsia que en el grupo control¹⁰¹. Sin embargo, otro estudio coreano realizado por Kim et al no encontró ninguna asociación significativa entre polimorfismos del VEGF y el desarrollo de preeclampsia¹⁰².

Por otro lado, Banyasz et al, reportaron que la presencia del genotipo +405 G/C podría disminuir la susceptibilidad al desarrollo de preeclampsia severa, y que la progresión de la enfermedad podría estar acelerada por la presencia del alelo -2578 C/A¹⁰³.

También se han estudiado la asociación de la preeclampsia con los diferentes haplotipos, es decir la combinación de los distintos genotipos de cada polimorfismo individual. Sandrim et al, encontraron un efecto protector del haplotipo: -2578C, -1154G y -634C, contra el desarrollo de preeclampsia, que está asociado a una alta expresión génica de la proteína VEGF¹⁰⁴.

Por su parte Garza-Veloz et al, en un estudio en mujeres mexicanas, no encontró ninguna asociación estadística significativa en las frecuencias de alelos, genotipos y haplotipos de los polimorfismos VEGF estudiados: -2578 C/A, -1154 G/A, +405 G/C y -7 C/T¹⁰⁵.

Finalmente, Cheng et al, en un reciente metaanálisis de 11 estudios de casos y controles, con un total de 1.069 casos de PE y 1.315 controles, encontraron asociación significativa entre los polimorfismos +936C/T y -634G/C y el desarrollo de preeclampsia; no así para los SNPs -2578C/A y -1154 G/A, que no muestran ninguna relación con la preeclampsia¹⁰⁶. De forma similar, Song GG et al, en su metanálisis de 10 estudios, con 950 casos de preeclampsia y 1118 controles, encontró asociación significativa entre el alelo -634 C y el desarrollo de preeclampsia; y entre el alelo +936 T con preeclampsia, solo en el grupo de mujeres asiáticas, pero no en mujeres

europeas. Los polimorfismos -2578C/A y -1154G/A no mostraron ninguna asociación estadística con la preeclampsia¹⁰⁷.

II.6. ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DEL PRECURSOR DEL PÉPTIDO NATRIURÉTICO TIPO B CON LA PREECLAMPSIA

I.6.1. Péptidos natriuréticos y preeclampsia.

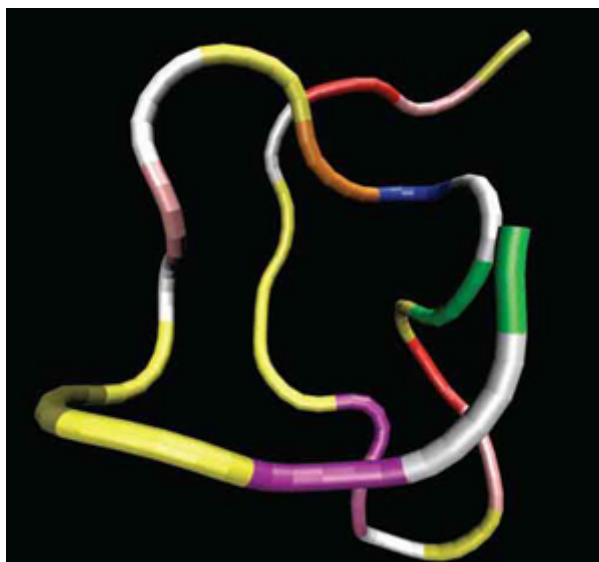
Los péptidos natriuréticos forman parte de una familia de proteínas de estructura similar, pero genéticamente distintas. Se han identificado 5 tipos de péptidos natriuréticos, el péptido natriuréticos auricular (ANP) y cerebral (BNP) son de origen cardiaco, el péptido natriurético tipo C (CNP) es de origen endotelial, el péptido natriurético tipo D (Dendroaspis natruretic) se ha aislado recientemente en serpientes, y la urodilatina. Los más útiles desde el punto de vista clínico son el ANP y el BNP.¹⁰⁸

El péptido natriurético auricular (ANP) y péptido natriurético cerebral o tipo B (BNP) son dos hormonas sintetizadas por el músculo cardiaco, en la aurícula y el ventrículo respectivamente, en respuesta al aumento de volumen y presión cardiacos. La acción fisiológica que cumplen es disminuir la sobrecarga de trabajo cardiaco, incrementando la natriuresis y diuresis, aumentando la permeabilidad capilar y relajando el tono vascular periférico^{109,110}.

Los genes de las proteínas precursoras de ANP y BNP, están localizados en íntima relación, en el brazo corto del cromosoma humano 1, banda p36¹¹¹.

El BNP es sintetizado a partir de un pre-propéptido (pre-pro BNP), que a través de una escisión proteolítica da lugar a un fragmento N terminal de 108 aminoácidos (pro BNP) y un péptido señal de 26 aminoácidos. El pro BNP es adicionalmente dividido, para formar la hormona activa de 32 aminoácidos y el fragmento amino terminal (NT-pro BNP), biologicamente inerte. (figura5)^{112,113}

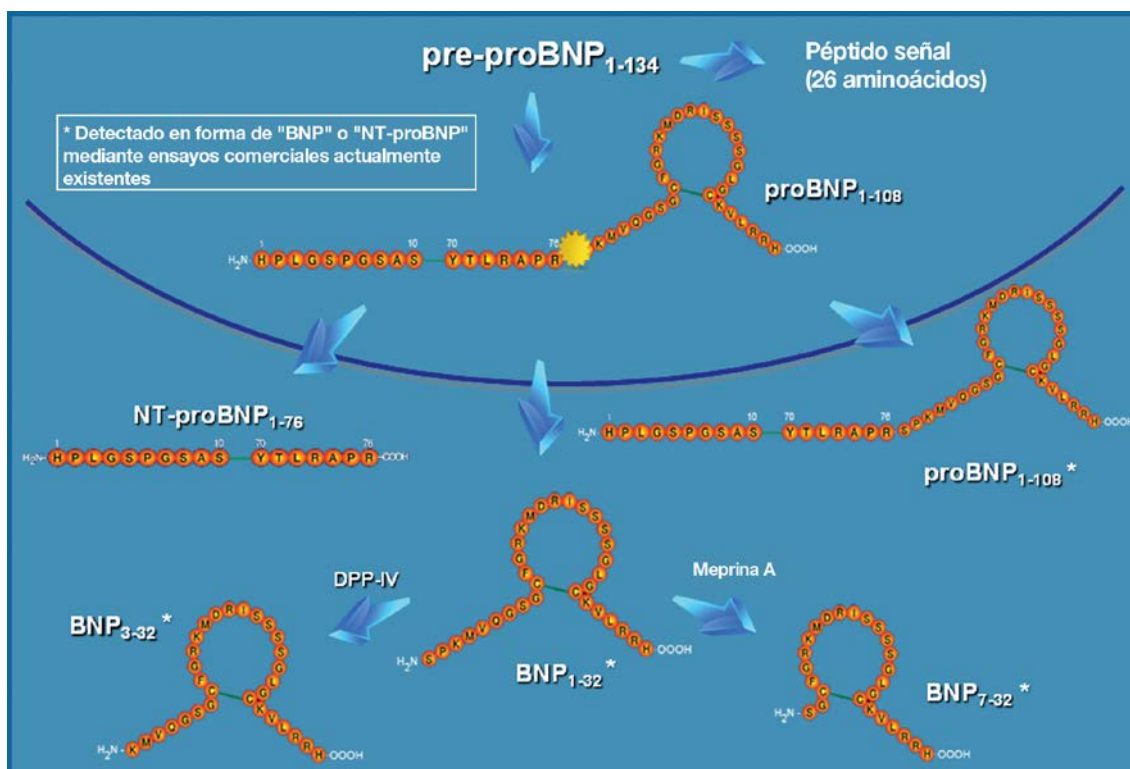
Figura 5. Estructura del Péptido natriurético auricular. Tomado de protein data bank



El tiempo de vida media del BNP es aproximadamente 20 minutos. Se une a receptores transmembrana de guanil ciclasa o receptores de peptidos natriuréticos. Estos receptores median la conversión de guanosin trifosfato a guanosina monohidrato cíclico¹¹⁴.

En mujeres no embarazadas los niveles de BNP y pro BNP , pueden ayudar a detectar la hipofunción ventricular izquierdo y el pronóstico de la insuficiencia cardiaca^{115,116}.

En mujeres embarazadas también se podría usar como un predictor de preeclampsia. En el embarazo normal, los niveles de ANP, se mantienen en el intervalo previo a a la gestación, a pesar del aumento del volumen plasmático¹¹⁷.

Figura 6. Biología del sistema del péptido natriurético (Kim YJ et al, 2011) ¹⁰²

BNP: péptido natriurético cerebral; NT-proBNP, porción aminoterminal del pro-péptido natriurético tipo B; y DPP-IV, dipeptidil peptidasa-4.

En un estudio Resnik demostró que la mediana de los niveles de BNP era menor de 20 pg/ml permaneciendo estable durante todo el embarazo normal, sin embargo dichos niveles se incrementaban significativamente en los casos de preeclampsia grave¹¹⁸.

Tihtonen et al, concluyeron que este incremento era el resultado del esfuerzo cardíaco provocado por el aumento de la postcarga, secundaria al vasoespasmo arteriolar e hipertensión propias de la preeclampsia¹¹⁹.

Otros estudios también han confirmado dichas observaciones¹²⁰⁻¹²². Itoh et al, detectaron un aumento significativo del BNP en mujeres con preeclampsia en comparación con mujeres con gestación normal y en no gestantes¹²³.

Pouta et al también demostraron un aumento de los péptidos natriuréticos en mujeres con preeclampsia, respecto a mujeres con hipertensión gestacional, y de éstas respecto a normotensas¹²⁴.

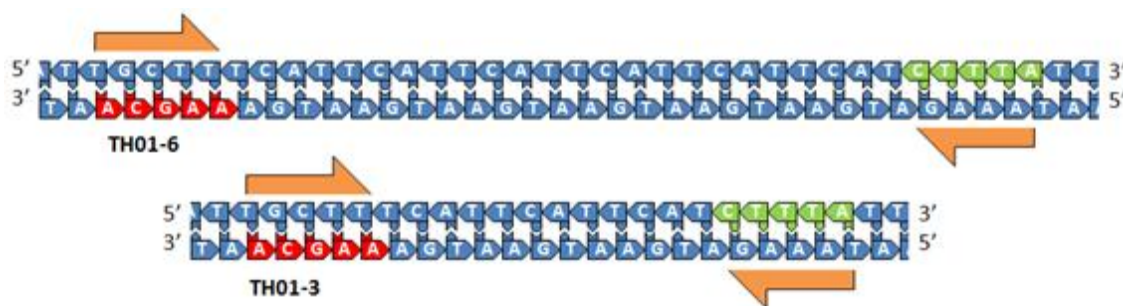
Okuno et al demostraron un aumento de los niveles de BNP en mujeres con preeclampsia, en comparación con ellas mismas en el periodo puerperal¹²⁵. Así mismo, Borghi et al demostraron niveles altos de ANP y BNP, en relación directa a cambios adaptativos estructurales y funcionales del ventrículo izquierdo en respuesta al incremento de la tensión arterial, en mujeres embarazadas que desarrollaron preeclampsia¹²⁶.

I.6.2. Polimorfismo genético del precursor del péptido natriurético tipo B asociado a preeclampsia

Según todos los estudios descritos, parece claro que existe un aumento significativo de los niveles de factores natriuréticos en pacientes que desarrollan preeclampsia; por esta razón recientemente se ha estudiado una posible predisposición genética para que esto ocurra. En este sentido se han realizado estudios de la secuenciación e identificación de posibles polimorfismos funcionales dentro de los genes que codifican estos péptidos. Ogawa et al reportaron que una región localizada en el extremo 5' del gen que codifica la proteína NPPB, que contiene 1,9 kilo bases de pares de nucleótidos, presenta una gran actividad transcripcional. Usando un modelo de delección mutante, se realizó la delección de las secuencias entre -1288 y -1095, demostrándose una importante reducción de la actividad transcripcional, cuantificada en un 30%. Estas secuencias delecionadas tienen una región característica rica en CT (-1248 a -1191), seguida por un tipo de secuencia de

repetición móvil, conocida como secuencia Alu (-1190 a -934). Con estos resultados, planteó la hipótesis de que las secuencias de repeticiones Alu tenían un rol regulatorio en la expresión del gen NPPB¹²⁷.

figura 7. Ejemplo de polimorfismo de repeticiones variables en tándem del gen de la tiroxina hidroxilasa humana (THO1, 11p15.5)



Kosuge et al, han descubierto un nuevo polimorfismo genético, del tipo de repeticiones variables (VNTR: variable number tandem repeat) (figura 7), localizado en el gen que codifica el NPPB, consistente en la repetición en un número variable de veces, de una secuencia corta de 4 nucleótidos (TTTC), localizada en la región adyacente al extremo 5' (-1241 nucleótidos desde el sitio de iniciación transcripcional), que podría estar asociado a hipertensión esencial en mujeres japonesas. Según este estudio, el número de pacientes con alelos de 16 repeticiones fue significativamente menor en el grupo de hipertensas, comparado con las normotensas. No hubo diferencias significativas en el caso de los varones¹²⁸.

Este mismo polimorfismo fue estudiado en gestantes preeclámpticas, encontrándose diferencias significativas en la distribución de alelos y genotipos. Reportaron que las mujeres preeclámpticas tenían una mayor frecuencia de genotipos y alelos de 11 repeticiones; y por el contrario menor frecuencia de genotipos 10 y 12¹²⁹.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Basados en:

Que existe evidencia que la etiología de la preeclampsia tiene en parte una base genética

Que los factores angiogénicos y antiangiogénicos, entre ellos el VEGF, juega un papel central en la fisiopatología de la preeclampsia. Y que en varios estudios reportados en la literatura, se encuentra asociación entre los polimorfismos genéticos de un único nucleótido (SNP):-2578 A/C, -1154 A/G y +936 C/T del gen VEGF, con el desarrollo de preeclampsia.

Que está demostrado que los péptidos natriuréticos incrementan sus niveles en pacientes con preeclampsia, y que se ha reportado un nuevo polimorfismo del tipo de repeticiones variables, consistente en la repetición de una secuencia corta de 4 nucleótidos (TTTC), localizado en el gen del precursor del péptido natriurético tipo B (NPPB), que podría estar asociado al desarrollo de preeclampsia.

Planteamos la siguiente hipótesis: ***Determinados alelos y genotipos de los polimorfismos del gen VEGF: -2578 A/C, -1154 A/G y +936 C/T, y del polimorfismo (TTTC)_n del gen NPPB en mujeres embarazadas, predisponen al desarrollo de preeclampsia.***

IV. OBJETIVOS

IV.1. OBJETIVO PRINCIPAL:

1. Determinar si existe asociación entre alguna forma de los polimorfismos VEGF: -2578 A/C, -1154 A/G y +936 C/T , y el desarrollo de preeclampsia.
2. Determinar si existe asociación entre alguna forma del polimorfismo (TTTC)_n del gen NPPB y el desarrollo de preeclampsia.

IV.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS:

1. Determinar si existe asociación entre alguna forma de los polimorfismos VEGF: -2578 A/C, -1154 A/G y +936 C/T, y el desarrollo de preeclampsia leve y/o preeclampsia grave.
2. Determinar si existe asociación entre alguna forma de los polimorfismos VEGF: -2578 A/C, -1154 A/G y +936 C/T, y la aparición de preeclampsia precoz y/o preeclampsia tardía (menos de 34 semanas, 34 semanas o más de edad gestación, respectivamente).
3. Determinar si existe asociación entre alguna forma del polimorfismo (TTTC)_n del gen NPPB y el desarrollo de preeclampsia leve y/o preeclampsia grave.
4. Determinar si existe asociación entre alguna forma del polimorfismo (TTTC)_n del gen NPPB y la aparición de preeclampsia precoz y/o preeclampsia tardía (menos de 34 semanas, 34 semanas o más de edad gestacional, respectivamente).

V. PACIENTES Y MÉTODO

V.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se ha realizado un estudio de casos y controles, en una población de 150 gestantes, atendidas conjuntamente por la unidad de alto riesgo del servicio de Obstetricia y la unidad de hipertensión arterial del servicio de Cardiología, del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, durante el período de 2008-2012.

Durante dicho período de estudio, reclutamos a 59 pacientes que presentaron criterios diagnósticos de preeclampsia durante su embarazo, definidos como los siguientes ***criterios de inclusión*** :

-*Tensión Arterial $\geq 140/90$, en más de 2 ocasiones separadas por 6 horas, tomada con la paciente sentada, considerando la medida de tensión arterial diastólica cuando desaparecen los sonidos del latido cardíaco (V fase de Korotkow), siguiendo la metodología recomendada por la SEGO. (Documentos de consenso, SEGO 2007)*

-*Proteinuria significativa ≥ 300 mg medida en orina recogida durante 24 horas.*

Éstas a su vez, se clasificaron en dos grupos: **preeclampsia grave o en preeclampsia leve**, si cumplían o no alguno de los siguientes criterios:

-Tensión arterial $\geq 160/110$, en más de 2 ocasiones separadas por 6 horas.

-Proteinuria masiva ≥ 2 gramos, medida en orina recolectada durante 24 horas.

-Cefalea, alteraciones visuales o dolor epigástrico.

-Eclampsia, cianosis o edema pulmonar, hemorragia retiniana o papiledema.

-Creatinina sérica $> 1,2\text{mg/dL}$; enzimas hepáticas elevadas; plaquetas $< 100\ 000/\text{dL}$, anemia hemolítica microangiopática.

-Crecimiento intrauterino retardado. (Documentos de consenso, SEGO 2007)

También fueron clasificadas en **preeclampsia de aparición precoz y tardía**, según se hiciera el diagnóstico con menos de 34 semanas, o con 34 o más semanas de edad gestacional, respectivamente.

Como **grupo control**, seleccionamos al azar, a 91 mujeres multíparas, con al menos dos embarazos a término no complicados de bajo riesgo, que no hubieran presentado criterios diagnósticos de hipertensión arterial en ninguno de sus embarazos.

El comité de ética e investigación clínica del Hospital Clínico San Carlos, aprobó nuestro estudio. Todas las gestantes fueron informadas del estudio y manifestaron su deseo de participar en él, firmando el documento de consentimiento informado.

V.2. METODOLOGÍA

V.2.1. Metodología clínica

A todas las gestantes que participaron en el estudio, se les realizó una historia clínica y obstétrica completa al ingreso, y fueron seguidas durante su evolución durante el embarazo y tras el parto.

Se obtuvo una muestra de sangre en EDTA, de cada gestante incluida en el estudio, que se transportó al laboratorio de genética del Hospital Clínico San Carlos para su procesamiento y análisis.

V.2.2. Metodología analítica

Para el procesamiento de las muestras sanguíneas de los casos y controles, se siguieron los siguientes pasos: extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) y cuantificación de éste, determinación de los polimorfismos (SNPs) del gen del VEGF: -2578C/A, -1154G/A y +936C/T; y determinación del polimorfismo (TTTC)_n del gen NPPB

V.2.2.1. Extracción y cuantificación del ácido desoxirribonucleico

Extracción del ADN

Se extrajo el ADN de las muestras de sangre, utilizando el Kit de extracción QIAamp DNA Mini[®], que se basa en la tecnología de membrana de gel de sílice, para el aislamiento y purificación del ADN genómico.

El primer paso del protocolo consistió en agregar 200 µl de la muestra de sangre fresca o congelada, con 20 µl de proteasa Quiagen y 200 µl de solución tampón de lisis, mezcla que se incubó durante 10 minutos a 56 °C, para producir la lisis de la células presentes en la sangre. Luego se añadió 200 µl de etanol al 100 % para optimizar la unión del ADN a la membrana de la columna de centrifugación QIAamp Mini. El paso siguiente consistió en pasar la mezcla a una columna QIAamp Spin colocada sobre un tubo de 2 ml, para que usando la fuerza de la centrifugación el ADN genómico se absorba sobre la membrana de gel de sílice, a medida que la mezcla de lisado atraviese la columna. Finalmente se realizó el lavado de la membrana y elución (extracción) del ADN de la membrana en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, que se guardó a entre 2 y 8 °C

Cuantificación del ADN

La concentración de ADN se determinó por espectrofotometría. Las bases púricas y pirimidínicas que componen esta molécula absorben a 260 nm (D₂₆₀). Una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde con una concentración de ADN

de doble hebra de 50 µg/ml. Durante el proceso de extracción puede producirse contaminación proteica; por ello, es necesario determinar su pureza. Se realizó una segunda medida a 280 nm (D280), por ser la longitud de onda a la que absorben las proteínas. Se considera un ADN puro cuando la relación entre las absorbancias D260/D280 está comprendida entre 1,8 y 2. La cantidad de ADN se calcula a partir de la siguiente fórmula: $[ADN] = D260 \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{factor de dilución}$

A continuación se alicuotó el ADN, se identificaron los tubos de almacenamiento y se congelaron a -20 °C hasta su posterior procesamiento.

IV.2.2.2. Estudio de los polimorfismos genéticos del gen del factor de crecimiento vascular endotelial

La determinación de los **polimorfismos: -2578C/A, -1154G/A y +936C/T** del gen VEGF se realizó mediante la amplificación de cada secuencia, a partir del ADN extraído de las muestras de sangre mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, combinado con un análisis de la curva de crecimiento exponencial del amplificado.

- **Genotipado de polimorfismos mediante PCR en tiempo real:**

Para esta reacción se emplearon cebadores específicos para acotar la región de interés y sondas tipo TaqMan específicamente diseñadas para discriminar las dos variantes alélicas con marcaje diferencial. Las sondas estaban marcadas con una molécula fluorescente distinta (fluoróforo), la sonda normal con la molécula FAM y la sonda mutada con la molécula TET. Las tablas 5,6 y 7 muestran las secuencias de los cebadores y sonda utilizadas en cada polimorfismo estudiado.

Cada polimorfismo se analizó mediante una reacción de PCR individual en la que se deben incluyeron estos 2 cebadores que acotan el polimorfismo y las 2 sondas tipo Taqman marcadas con diferentes fluoróforos, que incluyen la secuencia nucleotídica del polimorfismo, utilizando un equipo Smart Cycler® de Cepheid®.

Esta técnica se basa en el diseño de los dos oligonucleótidos marcados, uno con el extremo 5', por una molécula que emite fluorescencia (fluoróforo o "reporter"), y en el extremo 3' por una molécula receptora de la fluorescencia ("quencher"). Ambos oligonucleótidos marcados a sondas, difieren en la molécula emisora de la fluorescencia, para poder diferenciarlos y determinar el genotipo.

Cuando la sonda no hibrida con el ADN, durante la amplificación, el fluoróforo no emite fluorescencia, que pueda ser captada por el equipo Smart Cycler, ya que el "quencher" absorbe esta frecuencia.

Por el contrario, cuando la sonda hibrida con el ADN, se une al amplicón acotado por los cebadores seleccionados. Durante las fases de hibridación/extensión la actividad 5' exonucleasa de la enzima polimerasa rompe la sonda y escinde el fluoróforo. En este momento el "quencher" deja de absorber la fluorescencia emitida, y el equipo Smart Cycler detecta y cuantifica la señal fluorescente. Ver figura 8.

En función de los resultados, si obtenemos señal de sólo uno de los fluoróforos es que la muestra analizada es homocigota para el alelo correspondiente; y si obtenemos señal de los dos fluoróforos, la muestra es heterocigota para el SNP en estudio.

La mezcla de la PCR a tiempo real contiene 12,5 µl de la enzima master de Applied Biosystems Taqman Universal PCR Master Mix, 2,5 µl de cada cebador(sense y antisense) con una concentración de 10 µM y 30 ng del DNA de cada paciente, y la cantidad de agua necesaria para obtener un volumen final de 25 µl.

Tabla 5. Secuencias de cebadores y sondas del polimorfismo -2578 C/A

POLIMORFISMO -2578 C/A	
Cebador sentido	5' CCA CAG AGG CTA TGC CAG CTG TA 3'
Cebador antisentido	5' GGT TTC TGA CCT GGC TAT TTC CA 3
Sonda normal	FAM-ACC CAG ATC G TG CCA G-MGB-NGQ
Sonda mutada	TET- CAC CCA GAT CTT GCC AG-MGB-NFQ

MGB: molécula que estabiliza las últimas pares de base de la sonda. NFQ: non fluorescent quencher.

Nucleótido en rojo indica la variación del SNP

Tabla 6. Secuencias de cebadores y sondas del polimorfismo -1154 G/A

POLIMORFISMO -1154 G/A	
Cebador sentido	5' CGG GCC AGG CTT CAC T 3'
Cebador antisentido	5' CCG CTA CCA GCC GAC TTT TAA 3
Sonda normal	FAM-CTC AGC CC C TCC ACA C-MGB-NFQ
Sonda mutada	TET- CCT CAG CCC TTC CAC AC-MGB-NFQ

MGB: molécula que estabiliza las últimas pares de base de la sonda. NFQ: non fluorescent quencher.

Nucleótido en rojo indica la variación del SNP

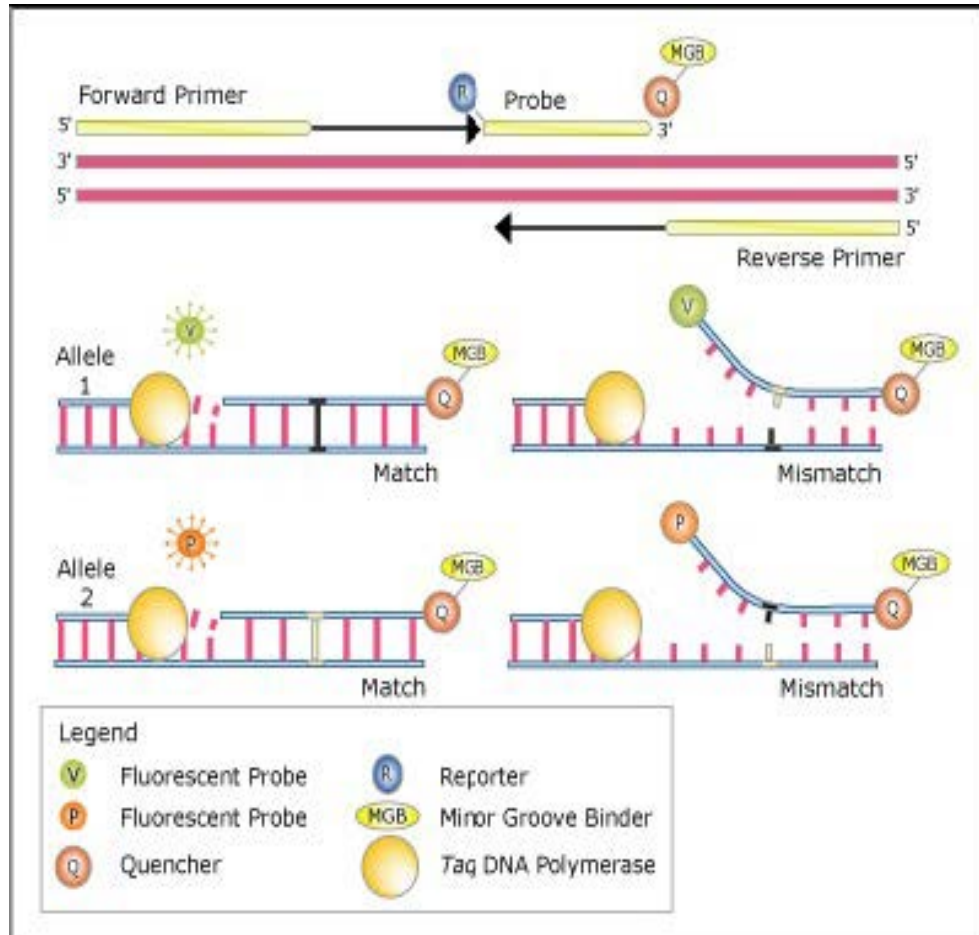
Tabla 7. Secuencias de cebadores y sondas del polimorfismo + 936 C/T

POLIMORFISMO +936 C/T	
Cebador sentido	5' ACT CCG GCG GAA GCA TTC 3'
Cebador antisentido	5' AGC AAG AAA AAT AAA ATG GCG AAT CCA 3
Sonda normal	FAM-CAA GAG GGA CC G TGC TG-NFQ
Sonda mutada	TET- AAG AGG GAC CAT GCT G-MGB-NFQ

MGB: molécula que estabiliza las últimas pares de base de la sonda. NFQ: non fluorescent quencher.

Nucleótido en rojo indica la variación del SNP

Figura 8. Genotipado del polimorfismos mediante PCR en tiempo real.



○ **Programa de amplificación.**

Para analizar los polimorfismos -2578 A/C y +936C/T, se realizó una desnaturalización inicial de 15 minutos a 95 °C. A continuación se efectuaron 45 ciclos consistentes en una desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos alternados con la hibridación de los cebadores con las secuencias específicas de ADN a amplificar a 60 °C durante 60 segundos en el Smart Cycler®

Para el polimorfismo -1154, el programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 15 minutos a 95 °C, seguida por 50 ciclos consistentes en una desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos, hibridación de los cebadores a 62 °C durante 60 segundos, extensión a 72 °C durante 60 segundos.

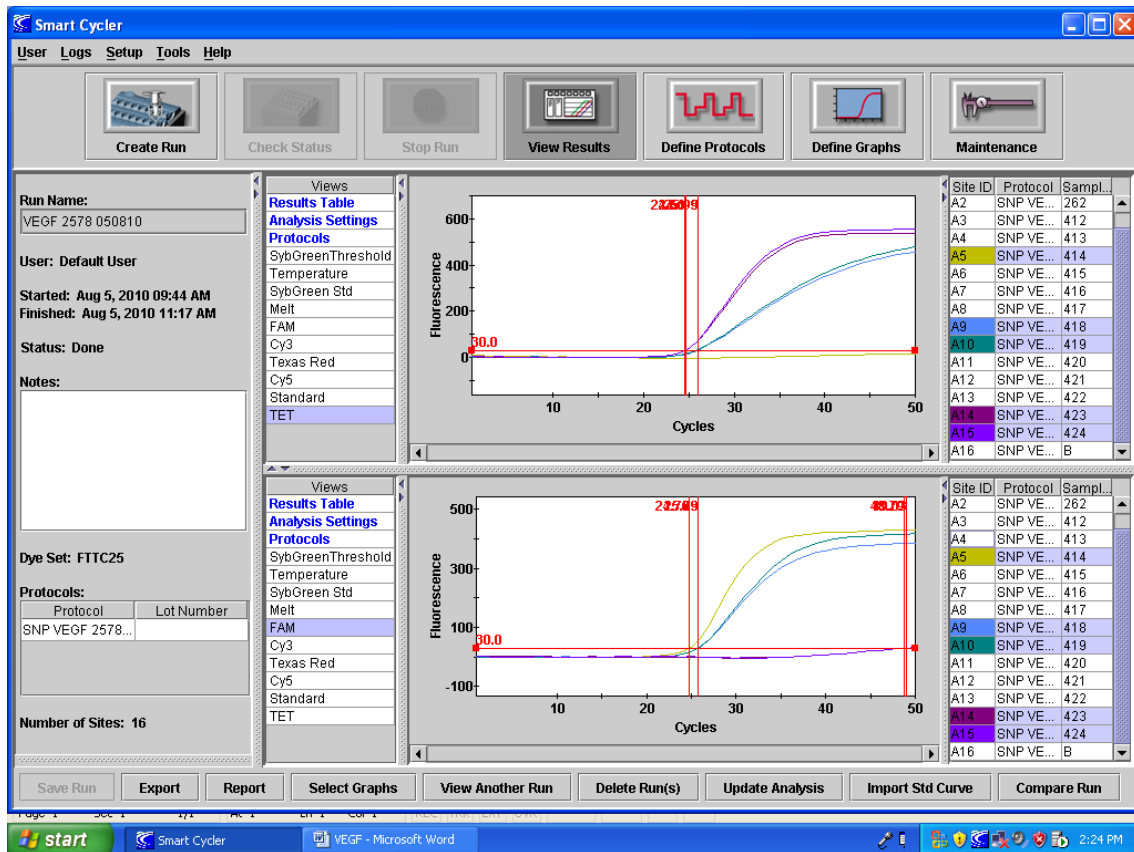
Para comprobar que la amplificación fue realizada correctamente, se incorporaron dos controles: negativo y positivo. El negativo tenía todos los reactivos de la muestra, excepto el ADN, en su lugar tenía agua destilada; y el positivo una muestra de ADN con el polimorfismo VEGF conocido.

- **Interpretación de las curvas de crecimiento exponencial de cada amplificado.**

En el polimorfismo -2578 A/C, el homocigoto mutado CC, muestra con el fluorocromo FAM una curva de crecimiento baja y tardía; y contrariamente con el fluorocromo TET que muestra una curva alta y temprana. En el polimorfismo homocigoto original AA, la curva con el fluorocromo FAM es alta y temprana, y al revés con el TET. Los heterocigotos presentan curvas intermedias a la de los homocigotos, para ambos fluorocromos. Ver figura 9

El polimorfismo -1154 A/G, es homocigoto original GG, cuando las curvas del fluorocromo FAM son altas y precoces; y las curvas TET son contrarias. Es homocigoto mutado AA, si las curvas TET son altas y precoces; y las FAM contrarias. Y es heterocigotos GA si ambos fluorocromos presentan curvas intermedias.

Y el polimorfismo +936 C/T es homocigoto original CC, cuando se obtiene una curva FAM alta y de inicio temprano; con una curva TET opuesta. Es homocigoto mutado AA, cuando las curvas TET son altas y precoces; y las FAM contrarias. Y es heterocigoto CT si ambos fluorocromos presentan curvas intermedias.

Figura 9. Interpretación de las curvas de amplificado de la fluorescencia del SNP -2578

En los resultados del marcaje con TET (sonda con mutación) se observan 3 curvas diferentes.

- Pacientes 423 y 424 presentan las curvas mas pronunciadas
- Pacientes 418 y 419 presentan curvas intermedias
- Paciente 414 no hay curva, no hay señal de fluorescencia.

En los resultados del marcaje con FAM (sonda wild type) también se observan 3 tipos de fluorescencia:

- Paciente 414 presenta la curva mas pronunciada
- Paciente 418 y 419 presentan curvas intermedias
- Pacientes 423 y 424 no hay curva, no hay señal de fluorescencia.

Analizando ambos marcajes simultaneamente para cada paciente concluimos:

- Pacientes 423 y 424 son homocigotos para la mutación.
- Pacientes 418 y 419 son heterocigotos para el polimorfismo
- Paciente 414 es homocigoto *wild type*

V.2.2.3. Estudio del polimorfismo del gen del precursor del péptido natriurético tipo B

Después de realizarse la extracción y cuantificación de ADN genómico, según la técnica descrita anteriormente, se procedió a realizar la amplificación del polimorfismo (TTTC)_n del gen NPPB.

El ADN se amplificó en un volumen final de 25 µl conteniendo 100 ng de ADN. Los cebadores utilizados fueron 5' - FAM - AAG GAG GCA CTG GGA GAG GGG AAA T - 3' (sense) y 5' - AAT TAG CTG GGC ATG GTG GCA GGC G - 3' (antisense) . La mezcla de PCR contenía 200 µM de dNTP, 1-2 mM de MgCl₂ , 400 nM de cada cebador y 1 U de Taq polimerasa.

El tamaño de los productos amplificados se determinó por electroforesis en un gel Genetic Analyzer POP4 utilizando ABI 3100 (PE Applied Biosystems) . Los resultados se analizaron con el software de análisis GeneScan (PE Applied Biosystems).

IV.2.3. Metodología estadística

Inicialmente se realizó una estadística básica descriptiva de las variables. Luego se analizarán las relaciones existentes entre las variables estudiadas y su asociación con el desarrollo de la preeclampsia, su severidad (leve y grave) y su aparición (precoz y tardía).

Las variables cuantitativas se expresan como media y desviación estándar (DE). Las variables cualitativas se presentan con su distribución de frecuencias.

Se analizó el comportamiento de las variables cuantitativas por cada una de las variables independientes categorizadas mediante el test de la t de Student (en

comparaciones de una variable con dos categorías) y/o el análisis de la variancia (mas de dos categorías) (ANOVA). En todos los casos se comprobó la distribución de la variable frente a los modelos teóricos y se contrastó la hipótesis de homogeneidad de variancias. Se corrigió el nivel de significación para contrastes múltiples con el test de Bonferroni.

Se evaluó la asociación entre variables cualitativas de distribución de genotipos y alelos del gen VEGF y del gen NPPB con el desarrollo de la preeclampsia, su severidad (leve y grave) y su aparición (precoz y tardía); con el test de chi cuadrado (χ^2) y, en el caso de que un 25 % o más de los esperados fueran menores de 5, por la prueba exacta de Fisher.

Como requisito previo al análisis de asociación, realizamos el test de equilibrio de Hardy-Weinberg, tanto en el grupo de controles, como en el grupo de casos; mediante el test de chi cuadrado (χ^2)¹³⁰.

En todos los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula con un error de tipo I o error α menor a 0,05. ($p < 0,05$)

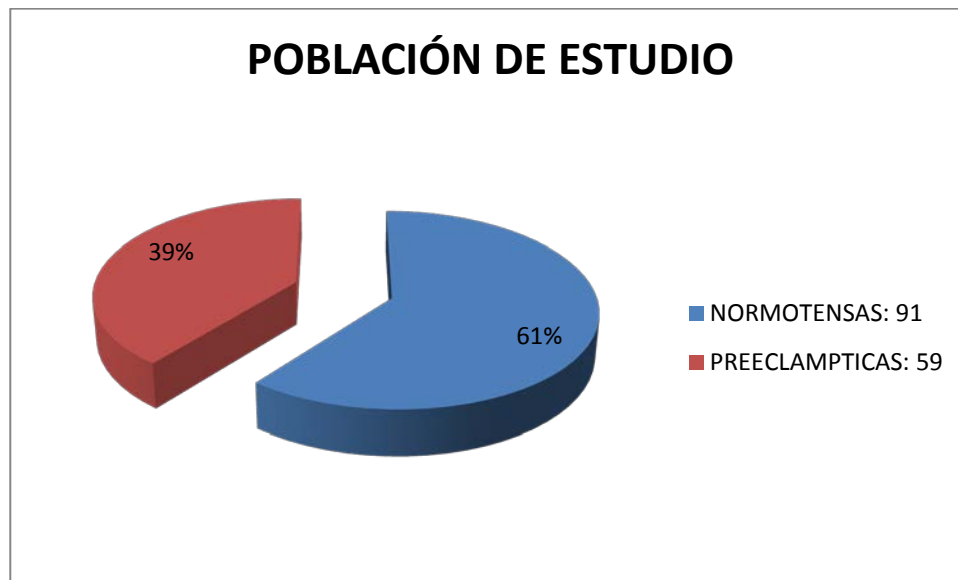
El paquete informático utilizado para el análisis fue SPSS para Windows versión 12.0. Software (SPSS.Inc Chicago, ILL III).

VI. RESULTADOS

VI.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN

La población objeto de nuestro estudio se compone de un total de 150 gestantes, 91 controles normotensas y 59 preeclámpticas. Fueron reclutadas como controles aquellas mujeres que tuvieron al menos dos embarazos a término sin criterios de preeclampsia. Ver figura 10.

Figura 10. Población de estudio.



El grupo de las 59 gestantes preeclámpticas fue dividido de acuerdo con la presencia o ausencia de criterios de gravedad en: preeclampsia leve (n=26) y preeclampsia grave (n=33); y de acuerdo a la edad gestacional de aparición (antes o después de la semana 34) en: preeclampsia precoz (n=13) y preeclampsia tardía (n=46). Ver figuras 11 y 12.

Dentro del grupo de pacientes con preeclampsia grave, 4 mujeres presentaron síndrome HELLP y 3 eclampsia; sin producirse ninguna muerte materna. Sin embargo, hubo una muerte perinatal de un recién nacido de madre con preeclampsia precoz y grave, prematuro extremo de 26 semanas con CIR.

Figura 11. Clasificación del grupo de casos en función de la gravedad.

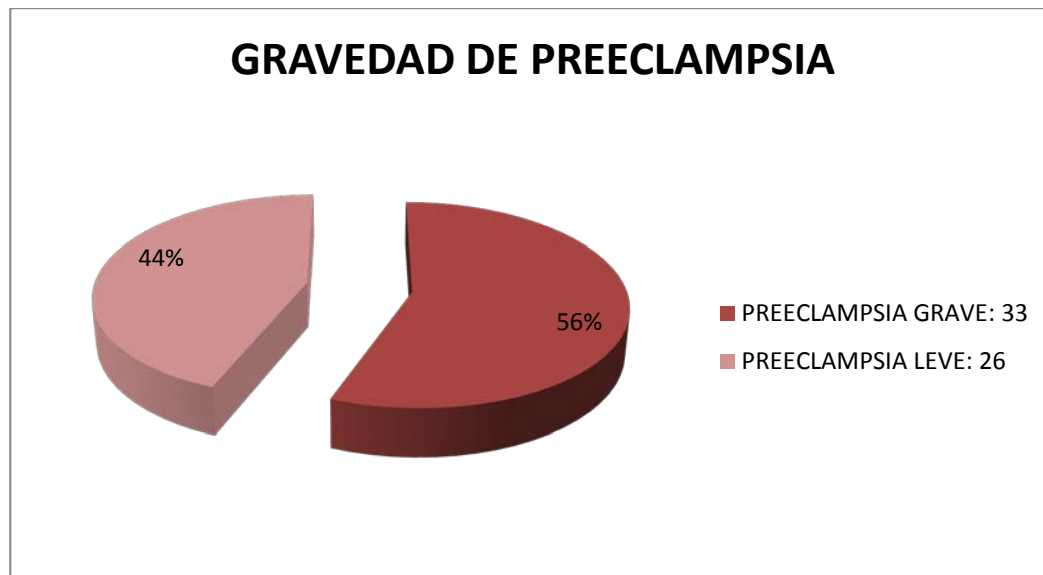
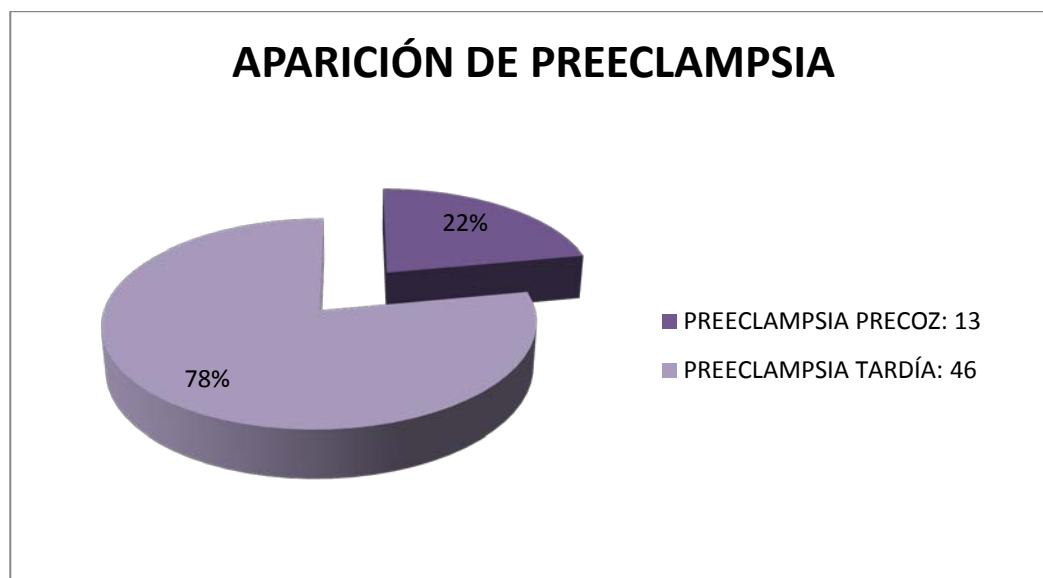


Figura 12. Clasificación del grupo de casos en función de aparición.



En la tabla 8 presentamos las características clínicas y los resultados perinatales de nuestra población de estudio, comparando las gestantes normotensas con aquellas que presentaron preeclampsia leve y preeclampsia grave.

Respecto a las características clínicas, no se encontraron diferencias significativas en relación a edad materna, raza, índice de masa corporal (IMC) y tabaquismo.

La edad materna presenta una distribución similar, con una media de 31 años en todos los grupos ($p=0,75$).

Dentro de esta población de estudio, existe predominio de la raza blanca en los tres grupos, seguida por la latinoamericana; con una pequeña proporción de raza negra y otras razas (asiática, árabe y etnia gitana). En el grupo de preeclampsia grave hay una frecuencia mayor de raza negra (9,09%) respecto al grupo de preeclampsia leve (3,84%) y de normotensas (3,29%); aunque sin llegar a ser estadísticamente significativa ($p= 0,84$). (ver figura 4)

El IMC fue mayor en las gestantes con preeclampsia leve ($28 \pm 4,2$) comparado con aquellas gestantes con preeclampsia grave ($25,8 \pm 5,1$), y de éstas a su vez con las normotensas ($24 \pm 4,1$); diferencias que no alcanzaron la significancia estadística ($p= 0,082$).

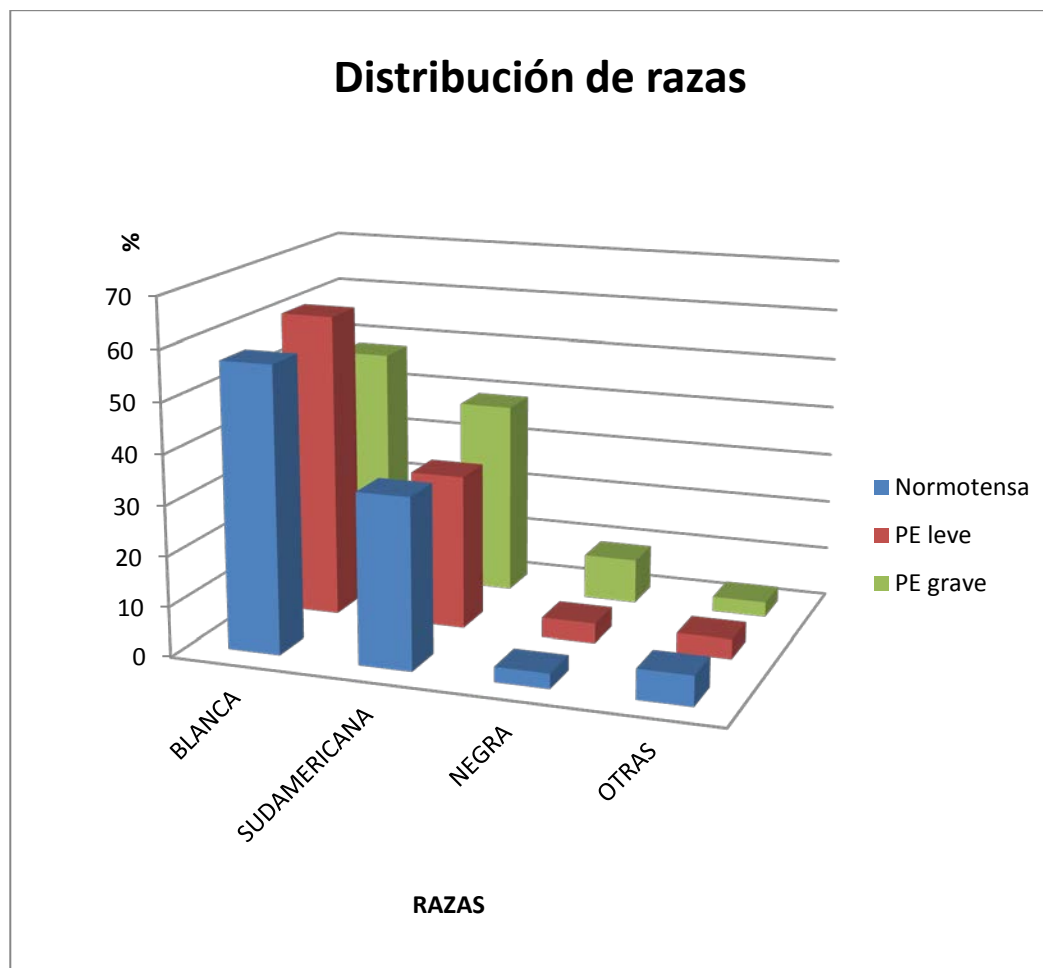
Cuando se analizó el hábito tabáquico, se encontró una mayor frecuencia de fumadoras en el grupo de las normotensas (12,1%) respecto a fumadoras con preeclampsia leve (3,8%) y preeclampsia grave (3,0%); aunque, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,143$).

Sin embargo, si se encontraron diferencias significativas en los resultados perinatales. Hubo una alta tasa de cesáreas en el grupo de mujeres con preeclampsia grave (84,8%) respecto al grupo de mujeres con preeclampsia leve (54,7%), y también respecto a las normotensas (9,9%), (**$p < 0,001$**).

Tabla 8. Características clínicas y resultados perinatales de las gestantes en función de la gravedad de la preeclampsia.

Característica	Normotensas N=91	PE leve N=26	PE grave N=33	p
Edad materna	31,8	31,4	31,3	0,751
Raza(%)				
Blanca	57,14	61,53	48,48	0,839
Latinoamericana	34,06	30,76	39,39	
Negra	3,29	3,84	9,09	
Otras	5,49	3,84	3,03	
IMC (kg/m2, mediana± DE)	24 ± 4,1	28 ± 4,2	25,8 ± 5,1	0,082
Fumadora (%)	12,1	3,8	3,0	0.143
Cesarea (%)	9,9	57,7	84,8	p < 0,001
EG en el parto (semanas, mediana)	39,29	38,31	34,79	p < 0,001
Peso al nacer (gr, mediana, DE)	3297 (3224-3370)	3008 (2852-3164)	2266 (2018-2514)	p < 0,001

Así mismo, los recién nacidos de madres con preeclampsia grave tuvieron menor edad gestacional (34,8 semanas) y peso al nacer (2266 gramos) que aquellos recién nacidos de madres con preeclampsia leve (38,3 semanas, 3008 gramos) y de aquellos recién nacidos de madres normotensas (39,29 semanas, 3297 gramos) (**p < 0,001**).

Figura 12. Distribución de razas en función de la gravedad de la preeclampsia.

También se realizó la comparación de las mismas características clínicas y perinatales entre las gestantes normotensas versus las gestantes con preeclampsia precoz y preeclampsia tardía. Se obtuvieron resultados similares que aparecen reflejados en la tabla 9.

La edad materna, raza, IMC y tabaquismo, no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos.

La edad materna fue ligeramente mayor en el grupo de preeclampsia precoz (32,7 años) comparada con el grupo de gestantes normotensas (31,8 años) y de preeclámpsicas tardías (31,6 años) no presentando diferencias significativas ($p=0,81$).

La distribución de razas fue similar, con un predominio de la raza blanca, seguida por la sudamericana y una pequeña proporción de la raza negra y de otras razas. Sin embargo, en el grupo de preeclampsia precoz observamos un mayor porcentaje de mujeres latinoamericanas que mujeres blancas (46,15% vs 38,46%), sin ser esta diferencia de frecuencias significativas ($p=0,75$). Ver figura 12.

En cuanto a la tasa de cesáreas, encontramos una mayor frecuencia en el grupo de preeclampsia precoz (92,3%) respecto al grupo de preeclampsia tardía (67,4%) y también a las normotensas (9,9%) ($p < 0,001$).

La edad gestacional y peso al nacer fueron significativamente menores en el grupo de preeclampsia precoz (32,5 semanas, 2090 gramos), respecto al grupo de preeclampsia tardía (37,4 semanas, 2735 gramos) y de éste a su vez con el grupo de normotensas (39,3 semanas, 3297 gramos) ($p < 0,001$).

Tabla 9. Características clínicas y resultados perinatales de las pacientes incluidas en el estudio en función de la aparición de la preeclampsia

Característica	Normotensas N=91	PE precoz N=13	PE tardía N=46	p
Edad materna	31,82	32,69	31,57	0,808
Raza(%)				
Blanca	57,14	38,46	58,69	0,754
Sudamericana	34,06	46,15	32,60	
Negra	3,29	7,69	6,52	
Otras	5,49	7,69	2,17	
IMC (kg/m2, promedio ± DE)	24 ± 4,1	26,4 ± 3,9	26,9 ± 5,1	0,802
Fumadora (%)	12,1	0	4,3	0,087
Cesárea (%)	9,9	92,3	67,4	p < 0,001
EG en el parto (semanas, mediana)	39,29	32,46	37,43	p < 0,001
Peso al nacer (gr, mediana, DE)	3297 (3224-3370)	2090 (1542-2639)	2735 (2574-2896)	p < 0,001

VI.2. DESCRIPCIÓN DE LOS GENOTIPOS Y ALELOS DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL

Estudiamos la distribución genotípica y la frecuencia alélica de los tres polimorfismos estudiados: **-2578 A/C**, **-1154 A/G** y **936 C/T** en nuestra población de gestantes sanas, normotensas y preeclámplicas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 10.

La distribución de los genotipos de nuestra población, en función de las frecuencias de alelos encontradas, cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo de normotensas y preeclámplicas. La distribución de genotipos y alelos de los tres polimorfismos estudiados fue muy similar entre casos y controles, como se ve a continuación.

El **polimorfismo -2578 A/C**, presentó la siguiente distribución genotípica: el 18,7% de normotensas y el 15,3% de las preeclámplicas fueron homocigotas mutadas (CC); el 46,2% de las normotensas y el 40,7% de las preeclámplicas heterocigotas (CA); y el 35,2% de las normotensas y el 44% de las preeclámplicas se presentaron el estado homocigoto original (AA), según se observa en la figura 13. En cuanto a las frecuencias alélicas, el alelo mutado C se presentó en el 41,8% de normotensas y en el 35,6% de preeclámplicas; y el alelo original A en el 58,2% de normotensas y en el 64,4% de las preeclámplicas.

La distribución del **polimorfismo -1154 A/G** fue la siguiente: homocigotas mutadas (AA) encontramos al 12,1% de normotensas y al 11,9% de preeclámplicas; como heterocigotas (AG) al 33% de normotensas y al 25,4% de preeclámplicas; y como homocigotas originales (GG) al 59,4% de normotensas y al 62,7% de preeclámplicas (figura 14). Sus frecuencias alélicas para el alelo A fueron de 28,6% en normotensas y 25,4% en preeclámplicas; y para el alelo G de 71,4% en normotensas y 74,6% en preeclámplicas.

Tabla 10. Distribución genotípica y frecuencia alélica de los polimorfismos -2578 A/C, -1154 A/G y 936 C/T del gen VEGF de las gestantes normotensas y preeclámpticas.

GENOTIPO	Normotensas	Preeclámptica	ALELOS	Normotensas	Preeclámpticas
n(%)	N=91	N=59	n(%)	N=91	N=59
-2578 A/C			-2578 A/C		
CC	17 (18,7)	9 (15,3)	C	38(41,8)	21 (35,6)
CA	42 (46,2)	24 (40,7)	A	53(58,2)	38(64,4)
AA	32 (35,2)	26 (44)			
-1154 A/G			1154 A/G		
AA	11 (12,1)	7 (11,9)	A	26(28,6)	15 (25,4)
GA	30 (33)	15 (25,4)	G	65(71,4)	44 (74,6)
GG	50 (59,4)	37 (62,7)			
936 C/T			936C/T		
TT	3 (3,3)	2 (3,4)	T	15(16,5)	10 (16,9)
CT	24 (26,4)	16 (27,1)	C	76(83,5)	49 (83,1)
CC	64 (70,3)	41 (69,5)			

En el estudio del **polimorfismo 936C/T** encontramos una distribución con mayor similitud entre casos y controles. El 3,3% de normotensas y el 3,4% de preeclámpticas presentaron un genotipo homocigoto mutado (TT); el 26,4% de normotensas y el 27,1% de preeclámpticas presentaron un genotipo heterocigoto (CT) y el 70,3% de normotensas y el 69,5% de preeclámpticas presentaron el genotipo original homocigoto (CC); según se muestra en la figura 15. Del mismo modo, la frecuencia alélica, fue de 16,5% en normotensas y 16,9% en preeclámpticas para el alelo mutado T y 83,5% y 83,1% respectivamente, para el alelo original C.

Figura 13. Distribución genotípica del polimorfismo VEGF-2578, en el grupo de normotensas y preeclámpticas.

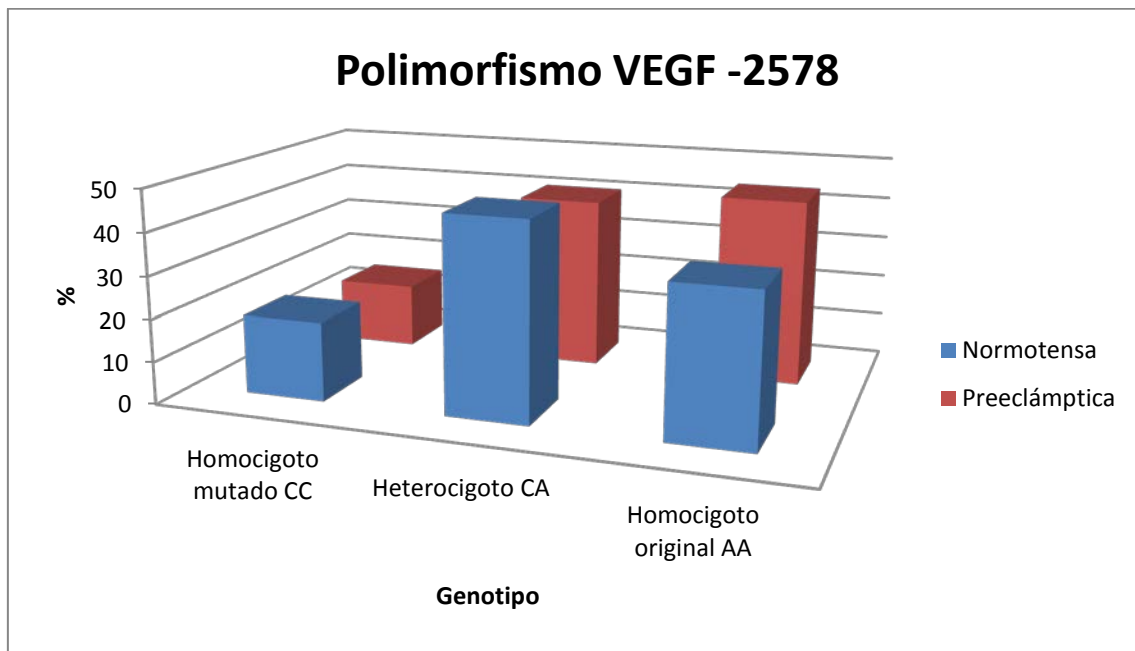


Figura 14. Distribución genotípica del polimorfismo VEGF-1154, en el grupo de normotensas y preeclámpticas.

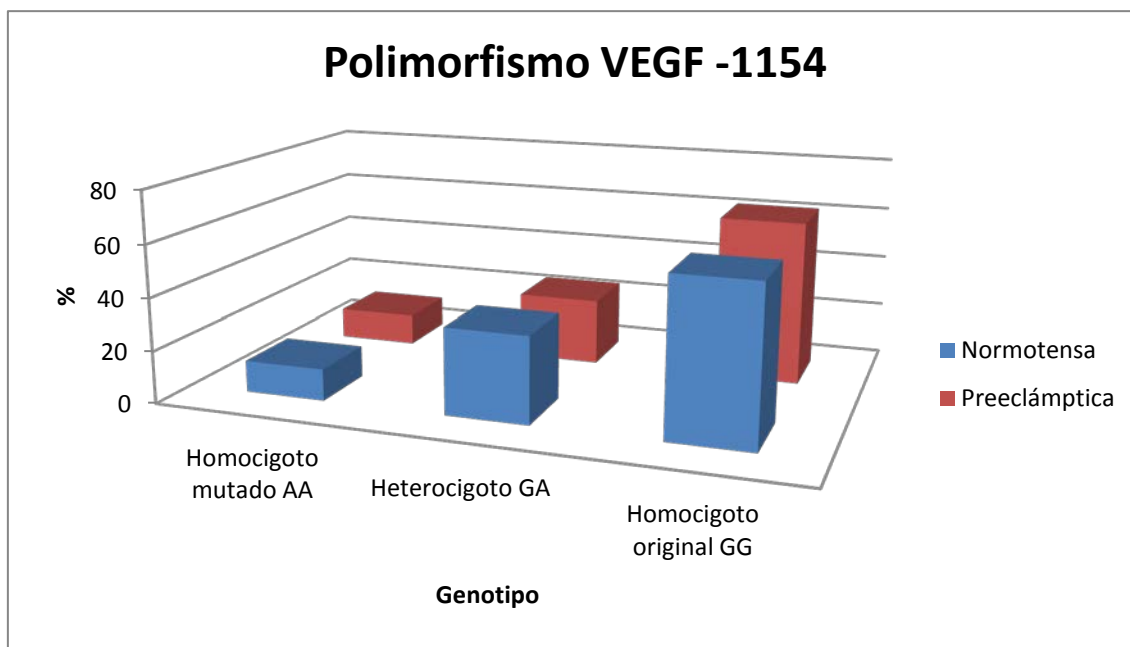
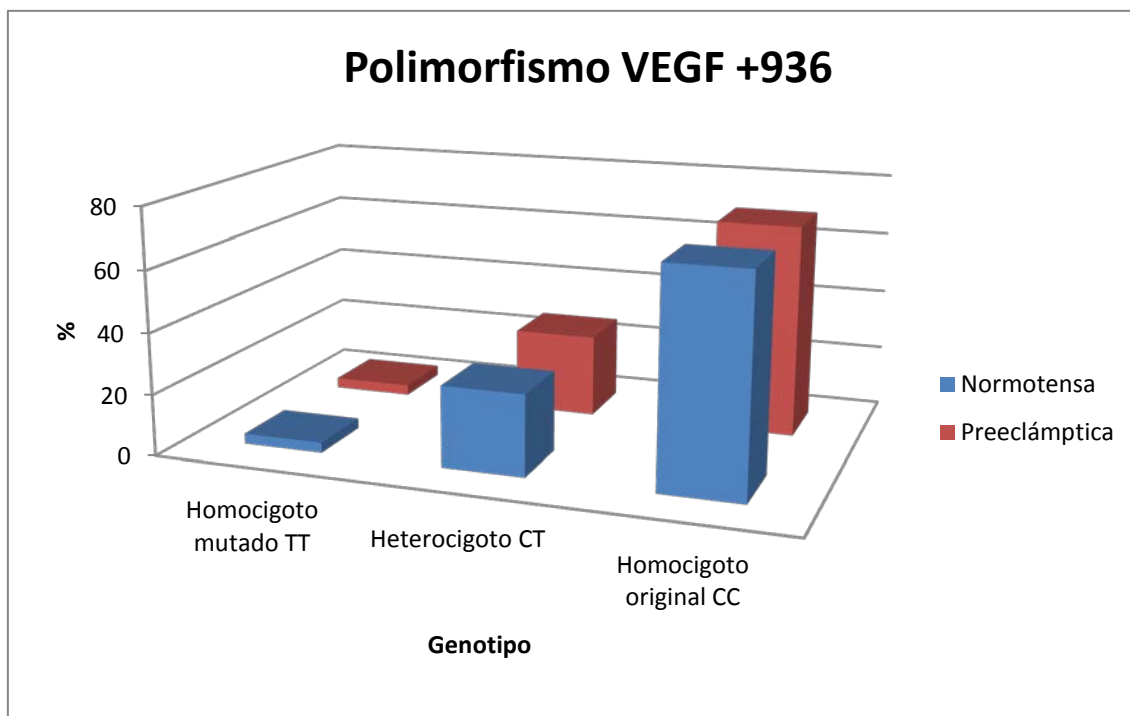


Figura 15. Distribución genotípica del polimorfismo VEGF+936, en el grupo de normotensas y preeclámpticas.



VI.3. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA Y DE LA FRECUENCIA ALÉLICA DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN VEGF CON LA PREECLAMPSIA, SU GRAVEDAD Y EDAD GESTACIONAL DE APARICIÓN

Hemos realizado el análisis estadístico de la relación de la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de los tres polimorfismos (SNPs) del gen del VEGF estudiados: -2578 A/C, -1154 A/G y +936 C/T; comparando el grupo control de gestantes normotensas respecto a las gestantes preclámpticas. Se ha realizado también el análisis comparativo, considerando la subclasificación en función de la gravedad de la preeclampsia: preeclampsia leve y grave; y de la edad gestacional de aparición en preeclampsia precoz y tardía.

La distribución genotípica de polimorfismos cumplió el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo de normotensas y preclámpticas, como requisito previo para el análisis.

VI.3.1. Normotensas *versus* Preeclámpticas

Al comparar la distribución de los genotipos de los tres polimorfismos del gen VEGF estudiados entre el grupo control de pacientes normotensas y las pacientes preclámpticas no encontramos diferencias significativas, siendo las frecuencias muy similares, sobretodo en el caso del SNP +936 (-2578 A/C, $p=0,54$; -1154 A/G, $p=0,59$ y +936 C/T, $p=0,99$) (Tabla 11).

El análisis de la distribución de la frecuencia alélica tampoco desveló relación significativa entre los factores analizados. (-2578 A/C, $p=0,56$; -1154 A/G, $p=0,81$ y +936 C/T, $p=0,95$) (Tabla 11).

Tabla 11. Distribución genotípica y frecuencia alélica del polimorfismo -2578 A/C, -1157 A/G y 936 C/T, comparando normotensas versus preeclámpticas.

	Normotensas	Preeclámpticas	p
	N=91	N=59	
-2578 A/C			
Genotipo n(%)			
CC	17(18,7)	9 (15,3)	0,54
CA	42 (46,2)	24 (40,7)	
AA	32(35,2)	26 (61)	
Alelos n(%)			
C	38(41,8)	21 (35,6)	0,56
A	53(58,2)	38(64,4)	
-1154 A/G			
Genotipo n(%)			
AA	11(12,1)	(11,9)	0,59
GA	30(33)	15 (25,4)	
GG	50(59,4)	37 (62,7)	
Alelo n(%)			
A	26(28,6)	15 (25,4)	0,81
G	65(71,4)	44 (74,6)	
936 C/T			
Genotipo n(%)			
TT	3(3,3)	2 (3,4)	0,99
CT	24(26,4)	16 (27,1)	
CC	64(70,3)	41 (69,5)	
Alelo n(%)			
T	15(16,5)	10 (16,9)	0,95
C	76(83,5)	49 (83,1)	

VI.2.2. Normotensas versus Preeclámpticas leves y graves.

Tampoco encontramos diferencias significativas cuando comparamos la distribución genotípica de los polimorfismos estudiados, en las gestantes normotensas respecto de los subgrupos de preeclampsia leve y grave. (Tabla 12).

En nuestra población de estudio, el genotipo homocigoto mutado -2578 CC fue menos frecuente en el grupo de preeclampsia grave (9,1%) respecto al grupo control de normotensas (18,7%), aunque no alcanzó significancia estadística ($p=0,41$).

La frecuencia del genotipo homocigoto mutado -1154 AA es menor en el grupo de preeclampsia leve (7,7%) respecto al grupo control (12,1%), sin alcanzar la significación estadística ($p=0,43$).

Con respecto al polimorfismo 936 C/T, el genotipo homocigoto mutado 936 TT es más frecuente en preeclampsia leve (7,7%), que en los controles sanos (3,3%), aunque tampoco es estadísticamente significativo ($p=0,53$).

Se analizó también la relación entre los alelos de cada polimorfismo y los grupos de pacientes normotensas, preeclampsia leve y preeclampsia grave. Como en el análisis de los genotipos, ninguno de los alelos de dichos polimorfismos presentó relación estadísticamente significativa. (Tabla 12)

Tabla 12. Distribución genotípica y frecuencia alélica del polimorfismo -2578 A/C, -1157 A/G y 936 C/T, comparando normotensas versus preeclámpticas leves y graves.

	Normotensas(<i>a</i>) N=91	PE leve(<i>b</i>) N=26	PE grave(<i>c</i>) N=33	p
-2578 A/C				
Genotipo n(%)				
CC	17(18,7)	6(23,1)		<i>a</i> vs <i>b</i> = 0,37
CA	42 (46,2)	8(30,8)		<i>a</i> vs <i>c</i> = 0,41
AA	32(35,2)	12(46,2)		
Alelo (%)				
C	38(41,8)	10(38,5)	11(33,3)	<i>a</i> vs <i>b</i> = 0,94
A	53(58,2)	16(61,5)	22(66,7)	<i>a</i> vs <i>c</i> = 0,52
-1154 A/G				
Genotipo n(%)				
AA	11(12,1)	2(7,7)	5(15,2)	<i>a</i> vs <i>b</i> 0,43
GA	30(33)	6(23,1)	9(27,3)	<i>a</i> vs <i>c</i> 0,79
GG	50(59,4)	18(69,2)	19(57,6)	
Alelo n(%)				
A	26(28,6)	5(19,2)	10(30,3)	<i>a</i> vs <i>b</i> = 0,48
G	65(71,4)	21(80,8)	23(69,7)	<i>a</i> vs <i>c</i> = 1
936 C/T				
Genotipo n(%)				
TT	3(3,3)	2(7,7)	0	<i>a</i> vs <i>b</i> 0,53
CT	24(26,4)	8(30,8)	8(24,2)	<i>a</i> vs <i>c</i> 0,56
CC	64(70,3)	16(61,5)	25(75,8)	
Alelo n(%)				
T	15(16,5)	6(23,1)	4(12,1)	<i>a</i> vs <i>b</i> = 0,63
C	76(83,5)	20(76,9)	29(87,9)	<i>a</i> vs <i>c</i> = 0,75

IV.2.3. Normotensas versus Preeclámpticas precoz y tardías

Finalmente, analizamos la relación de la distribución de los polimorfismos -2578 A/C, -1154 A/G y +936 C/T y su distribución alélica con las pacientes que presentaron preeclampsia precoz y tardía. Tras este análisis no encontramos diferencias significativas entre ninguno de los grupos ($p>0,05$).

La distribución de la frecuencia de los genotipos de los tres polimorfismos fue similar entre los tres grupos de pacientes y del mismo se observa la distribución de los alelos (Tabla 13).

VI.4. DESCRIPCIÓN DE LOS GENOTIPOS Y ALELOS DEL POLIMORFISMO DEL GEN DEL PRECURSOR DEL PÉPTIDO NATRIURÉTICO TIPO B

En todos los individuos de nuestra población, también se les realizó la determinación de este polimorfismo (TTTC)_n del gen NPPB. No se pudo determinar el genotipo en 2 controles normotensos, debido a que la región de ADN objeto de estudio estaba deteriorada y fue imposible su amplificación.

En nuestra población estudiada hemos encontrado diez alelos distintos, que van desde 6 repeticiones (TTTC) hasta 16 repeticiones, sin encontrar ninguno de 15 repeticiones (alelo 6,7,8,9,10,11,12,13,14,16). Estos alelos se hallaron combinados en diecinueve genotipos diferentes, como se muestran en la tabla 14.

Tabla 13. Distribución genotípicas y frecuencia alélica del polimorfismo -2578 A/C, -1157 A/G y 936 C/T comparando normotensas versus preeclámpticas precoces y tardías.

	Normotensas(<i>a</i>) N=91	PE precoz(<i>b</i>) N=13	PE tardía(<i>c</i>) N=46	p
-2578 A/C				
Genotipo n(%)				
CC	17(18,7)	2(15,4)	7(15,2)	<i>a</i> vs <i>b</i> = 0,26
CA	42 (46,2)	9(69,2)	15(32,6)	<i>a</i> vs <i>c</i> = 0,16
AA	32(35,2)	2(15,4)	24(52,2)	
Alelo n(%)				
C	38(41,8)	6(46,2)	15(32,6)	<i>a</i> vs <i>b</i> = 1
A	53(58,2)	7(53,8)	31(67,3)	<i>a</i> vs <i>c</i> = 0,39
-1154 A/G				
Genotipo n(%)				<i>a</i> vs <i>b</i> = 0,86
AA	11(12,1)	1(7,7)	6(13%)	<i>a</i> vs <i>c</i> = 0,39
GA	30(33)	5(38,5)	10(21,7)	
GG	50(59,4)	7(53,8)	30(65,2)	
Alelo n(%)				
A	26(28,6)	4(30,8)	11(23,9)	<i>a</i> vs <i>b</i> = 1
G	55(71,4)	9(69,2)	35(76,1)	<i>a</i> vs <i>c</i> = 0,71
936 C/T				
Genotipo n(%)				
TT	3(3,3)	0	2(4,3)	<i>a</i> vs <i>b</i> = 0,76
CT	24(26,4)	3(23,1)	13(28,3)	<i>a</i> vs <i>c</i> = 0,92
CC	64(70,3)	10(76,9)	31(67,1)	
Alelo n(%)				
T	15(16,5)	2(15,4)	9(19,6)	<i>a</i> vs <i>b</i> = 1
C	76(83,5)	11(84,6)	37(80,4)	<i>a</i> vs <i>c</i> = 0,83

Dentro de nuestra población, los diez alelos encontrados se distribuyeron de forma muy asimétrica, siendo claramente más frecuente el alelo 7, presentándose en el 62,9% de normotensas y en el 64,4 % de preeclámpticas. Estuvieron seguidos en frecuencia por el alelo 12, encontrándose en el 21,1% de normotensas y en el 20,3% de preeclámpticas. En tercer lugar, se encontró el alelo 13, portándolo el 5,6% de normotensas, y el 3,4% de preeclámpticas; y en cuarto lugar el alelo 9, en el 2,2% de normotensas y el 5,1% de preeclámpticas. Todos los demás alelos presentaron frecuencias más pequeñas (Tabla 14).

Cuando analizamos los genotipos observamos que el genotipo más frecuente fue el homocigoto 7/7, encontrándose en el 52,8 % de normotensas, y en el 42,4 % de preeclámpticas. El siguiente en frecuencia fue el genotipo 7/12, que se encontró en 16,8 % de normotensas y en 30,4 % de preeclámpticas. Los demás genotipos se encontraron en menor frecuencia (Tabla 7).

VI.5. ANALISIS DE LA RELACIÓN DE LOS GENOTIPOS Y ALELOS DEL POLIMORFISMO (TTTC)_n DEL GEN NPPB CON LA PREECLAMPSIA, SU GRAVEDAD Y EDAD GESTACIONAL DE APARICIÓN.

Hemos realizado el análisis estadístico de la relación de la distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas encontradas del polimorfismo (TTTC)_n del gen NPPB; comparando el grupo control de gestantes normotensas respecto a las gestantes preeclámpticas. Además se ha realizado el análisis comparativo, considerando la clasificación en función de la gravedad de la preeclampsia en leve y grave; y de la edad gestacional de aparición en precoz y tardía.

Tabla 14. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo (TTTC)n del gen NPPB en normotensas y preeclámpticas

	Normotensas N=89	Preeclámpticas N=59	P
GENOTIPOS n(%)			
6/7	1 (1,1)	3 (5,1)	0,11
6/12	1 (1,1)	0	
7/7	43 (52,8)	25 (42,4)	
7/8	3 (3,4)	2 (3,4)	
7/9	0	3 (5,1)	
7/11	0	1 (1,7)	
7/12	15 (16,8)	18 (30,5)	
7/13	4 (4,5)	1	
7/14	3 (3,4)	0	
8/12	3 (3,4)	1 (1,7)	
9/9	1 (1,1)	0	
9/12	2 (2,2)	0	
9/13	0	1 (1,7)	
9/16	0	1 (1,7)	
10/12	2 (2,2)	0	
10/13	1 (1,1)	0	
11/12	1 (1,1)	0	
12/12	5 (5,6)	3	
12/13	4 (4,5)	0	
ALELOS n(%)			
6	1 (1,1)	1 (1,7)	0,87
7	56 (62,9)	38 (64,4)	
8	3 (3,4)	1 (1,7)	
9	2 (2,2)	3 (5,1)	
10	1 (1,1)	0	
11	1 (1,1)	1 (1,7)	
12	19 (21,3)	12 (20,3)	
13	5 (5,6)	2 (3,4)	
14	1 (1,1)	0	
16	0	1 (1,7)	

Normotensas versus Preeclámpticas.

Al comparar la distribución de todas las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo del gen NPPB, del grupo control de gestantes normotensas, respecto de las gestantes preeclámpticas; no encontramos diferencias estadísticamente significativas (Tabla 14)

Normotensas versus Preeclámpticas leves y graves

Cuando hicimos el análisis estadístico de la distribución genotípica del polimorfismo (TTTC)n, comparando el grupo de las normotensas vs el grupo de preeclampsia leve, y vs el grupo de preeclampsia grave, encontramos una diferencia estadísticamente significativa (***p=0,05***) (tabla 15). Sin embargo cuando realizamos la misma comparación, mediante la frecuencia de alelos del gen, las diferencias no fueron significativas ($p=0,42$) (Tabla 15)

Normotensas versus Preeclámpticas precoces y tardías.

Tampoco existieron diferencias significativas al comparar la distribución genotípica y alélica del polimorfismo (TTTC)n, de las gestantes normotensas respecto de las preeclámpticas precoces y preeclámpticas tardías (genotipos, $p=0,35$; alelos $p=0,91$), (Tabla 16)

Tabla 15. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo (TTTC)n del gen NPPB comparando normotensas versus preeclámpticas leves y graves.

	Normotensas N=89	PE leve N=26	PE grave N=33	p
GENOTIPOS n(%)				
6/7	1 (1,1)	0	3 (9,1)	0,05
6/12	1 (1,1)	0	0	
7/7	43 (47,3)	10 (38,5)	15 (45,5)	
7/8	3 (3,3)	2 (7,7)	0	
7/9	0	2 (7,7)	1 (3)	
7/11	0	0	1 (3)	
7/12	15 (16,5)	9 (34,6)	9 (27,3)	
7/13	4 (4,4)	0	1 (3)	
7/14	3 (3,3)	0	0	
8/12	3 (3,3)	1 (3,8)	0	
9/9	1 (1,1)	0	0	
9/12	2 (2,2)	0	0	
9/13	0	1 (3,8)	0	
9/16	0	1 (3,8)	0	
10/12	2 (2,2)	0	0	
10/13	1 (1,1)	0	0	
11/12	1 (1,1)	0	0	
12/12	5 (5,5)	0	3 (9,1)	
12/13	4 (4,4)	0	0	
ALELOS n(%)				
6	1 (1,1)	0	1 (3)	0,42
7	56 (62,9)	16 (61,5)	22 (66,7)	
8	3 (3,4)	1 (3,8)	0	
9	2 (2,2)	2 (7,7)	1 (3)	
10	1 (1,1)	0	0	
11	1 (1,1)	0	1 (3)	
12	19 (21,3)	5 (19,2)	7 (21,2)	
13	5 (5,6)	1 (3,8)	1 (3)	
14	1 (1,1)	0	0	
16	0	1 (3,8)	0	

Tabla 16. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo (TTC)n del gen NPPB comparando normotensas versus preeclámpticas precoces y tardías.

	Normotensas N=89	PE precoz N=13	PE tardía N=46	P
GENOTIPOS n(%)				
6/7	1(1,1)	2(15,4)	1(2,2)	0,35
6/12	1(1,1)	0	0	
7/7	43(47,3)	6(46,2)	19(41,3)	
7/8	3(3,3)	0	2(4,3)	
7/9	0	1(7,7)	2(4,3)	
7/11	0	0	1(2,2)	
7/12	15(16,5)	3(23,1)	15(32,6)	
7/13	4(4,4)	1(7,7)	0	
7/14	3(3,3)	0	0	
8/12	3(3,3)	0	1(2,2)	
9/9	1(1,1)	0	0	
9/12	2(2,2)	0	0	
9/13	0	0	1(2,2)	
9/16	0	0	1(2,2)	
10/12	2(2,2)	0	0	
10/13	1(1,1)	0	0	
11/12	1(1,1)	0	0	
12/12	5(5,5)	0	3(6,5)	
12/13	4(4,4)	0	0	
ALELOS n(%)				
6	1 (1,1)	1 (7,7)	1 (2,2)	0,91
7	56 (62,9)	9 (69,2)	30 (65,2)	
8	3 (3,4)	0	1 (2,2)	
9	2 (2,2)	1 (7,7)	1 (2,2)	
10	1 (1,1)	0	0	
11	1 (1,1)	0	1 (2,2)	
12	19 (21,3)	1 (7,7)	10 (21,7)	
13	5 (5,6)	1 (7,7)	1 (2,2)	
14	1 (1,1)	0	0	
16	0	0	1 (2,2)	

VI.6. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE CADA ALELO CLASIFICADO COMO HOMOCIGOTO, HETEROCIGOTO Y OTROS, DEL GEN NPPB CON LA PREECLAMPSIA Y SU SEVERIDAD.

Dada la amplia variedad de distintos genotipos y alelos del polimorfismo (TTTC)n en nuestra población de estudio, y su baja frecuencia en muchos de ellos, realizamos un segundo análisis estadístico, clasificando los genotipos de la población en tres categorías: homocigotos, heterocigotos, y otros genotipos distintos, para cada alelo encontrado (alelos 6,7,8,9,10,11,12,13,14,16). Hicimos la comparación de las distribuciones genotípicas, entre normotensas y preeclámplicas, entre normotensas y preeclámplicas leves; y entre normotensas y preeclámplicas graves, debido a que en la comparación global obtuvimos un resultado cercano a la significancia estadística ($p=0,05$) (tabla 15). Sólo obtuvimos diferencias estadísticamente significativas cuando estudiamos el alelo 7 y el alelo 9, que explicamos a continuación.

VI.6.1. Análisis de la relación de los genotipos del alelo 7 del gen NPPB con la preeclampsia y su severidad.

Cuando analizamos la distribución de genotipos del alelo 7, clasificando la población estudiada en homocigoto 7, heterocigoto 7 y otros genotipos distintos, encontramos diferencias significativas, al comparar las pacientes normotensas y las preeclámplicas. En nuestro estudio observamos una mayor frecuencia de heterocigotos 7 en las pacientes preeclámplicas (47,4 %) que en las normotensas (29,2%); y una menor frecuencia de otros genotipos distintos al 7, en las preeclámplicas (10,1 %), que en las normotensas (22,5 %). ($p = 0,038$) (Tabla 17 y figura 16). El Odds Ratio de las portadoras heterocigotas 7 respecto a las portadoras de otros genotipos distintos fue 2,24 (IC 95%: 1,06-4,74) ($p=0,015$).

Sin embargo, cuando se realizó el análisis comparando las normotensas con las preeclámplicas leves y normotensas con preeclámplicas graves, las diferencias no fueron significativas ($p= 0,12$; $p=0,12$ respectivamente) (Tabla 10).

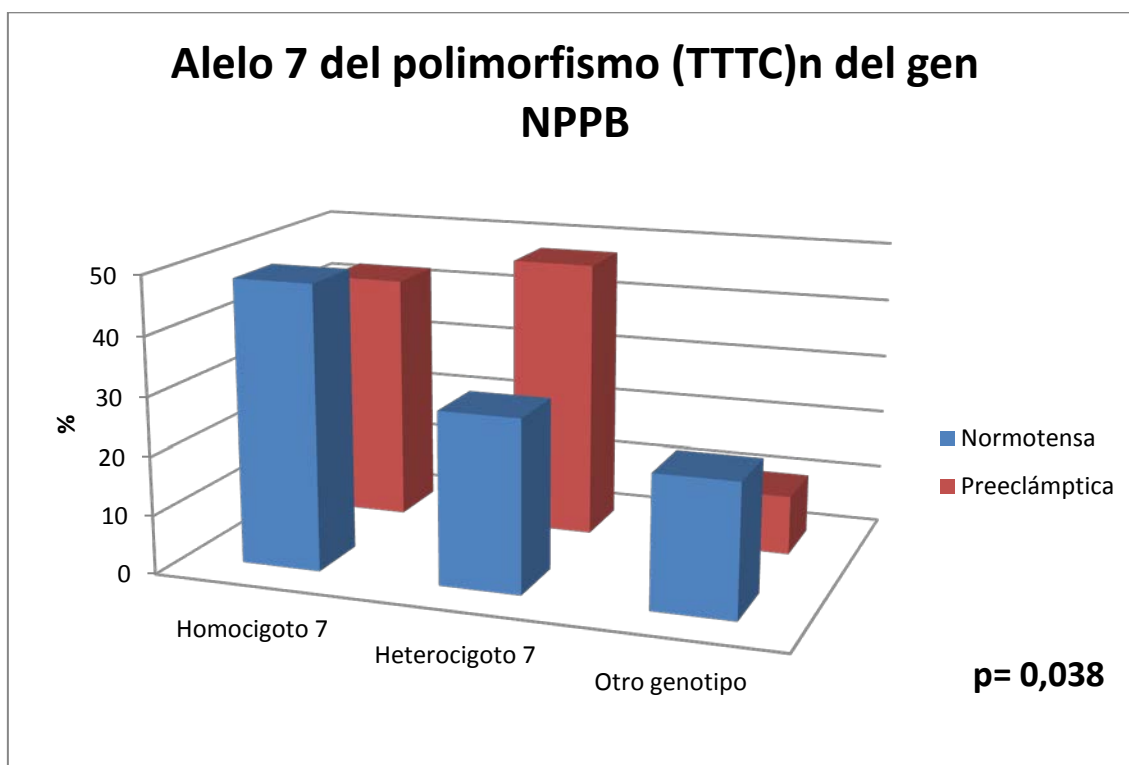
Tabla 17. Frecuencias genotípicas del polimorfismo 7 del gen NPPB comparando normotensas versus preeclámpticas leves y graves.

GENOTIPOS n(%)	Normotensas N=89	Preeclampsia N=59	PE leve N=26	PE grave N=33	p
Homocigoto 7	43(48,3)	25(42,4)	10(38,5)	15(45,5)	Normotensa vs PE leve 0,12
Heterocigoto 7	26(29,2)	28(47,4)	13(50)	15(45,5)	Normotensa vs PEgrave0,12
Otro genotipo	20(22,5)	6(10,1)	3(11,5)	3(9,1)	Normotensa vs PE 0,038

Homocigoto 7 vs otros genotipos; OR:1,59 (95%IC: 0,74-3,43) $p=0,20$

Heterocigoto 7 vs otros genotipos; **OR: 2,24 (95%IC:1,06-4,75) $p=0,015$**

Figura 16. Distribución genotípica del alelo 7 del gen NPPB, comparando normotensas y preeclámpticas.



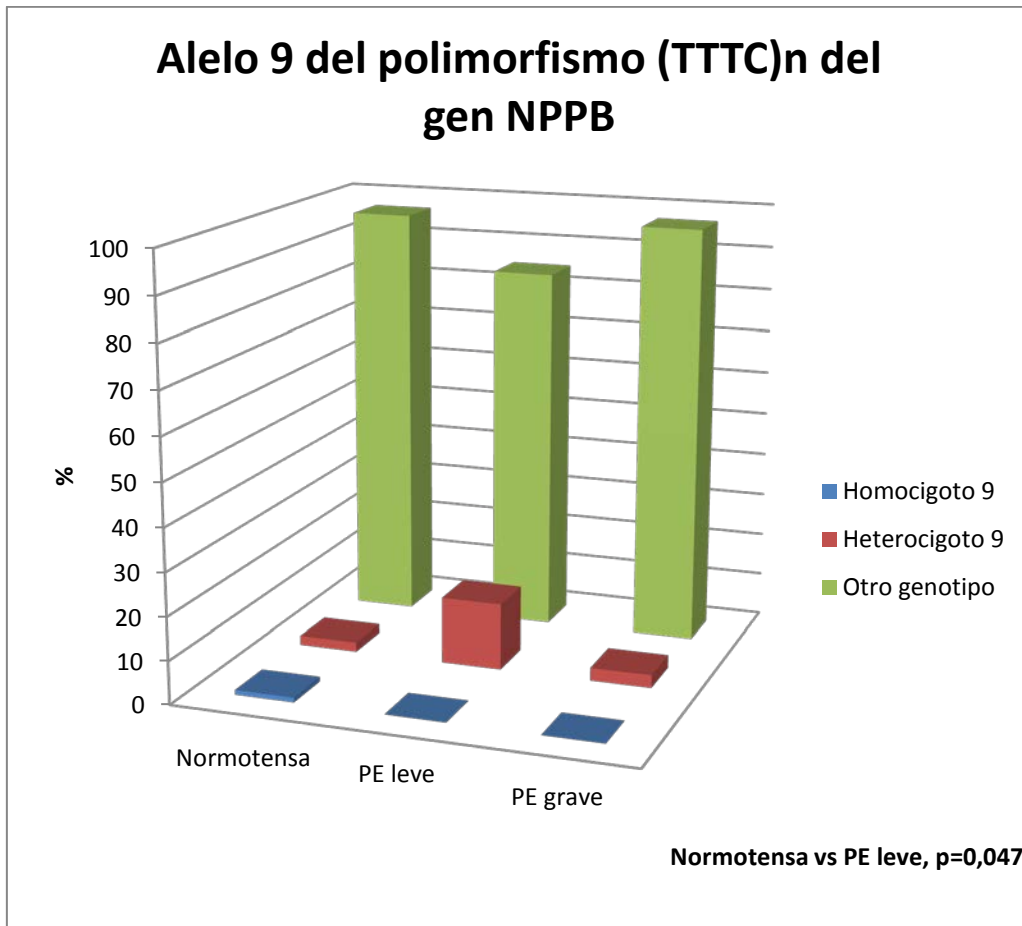
VI.6.2. Análisis de la relación de los genotipos del alelo 9 del gen NPPB con la preeclampsia y su severidad.

El análisis de los genotipos del alelo 9, clasificados como homocigoto 9, heterocigoto 9 y otros genotipos distintos, encontró diferencias estadísticamente significativas, al comparar las frecuencias de normotensas versus preeclámpticas leves (**p=0,047**). Hubo un 15,4 % de heterocigotas 9 en el grupo de preeclámpticas leves, comparado con el 2,2 % de heterocigotas 9 en el grupo de las normotensas; y un 96,6% de otros genotipos en el grupo de preeclámpticas leves, comparado con el 84,6% de otros genotipos en el grupo de las normotensas. No hubo, diferencias significativas cuando hicimos el mismo análisis, comparando normotensas con preeclámpticas y normotensas con preeclámpticas graves. (p= 0,137; 0,70 respectivamente)(tabla 18 y figura 17)

Tabla 18. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo (TTTC)9 del gen NPPB comparando normotensas versus preeclámpticas leves y graves.

GENOTIPOS n(%)	Normotensa N=89	Preeclampsia N=59	PE leve N=26	PE grave N=33	p
Homocigoto 9	1(1,1)	0	0	0	Normotensa vs PE leve 0,047 Normotensa vs PE grave 0,70 Normotensa vs PE 0,137
Heterocigoto 9	2(2,2)	5(8,5)	4(15,4)	1(3)	
Otro genotipo	86(96,6)	54(91,5)	22(84,6)	32(97)	

Figura 17. Distribución genotípica del alelo 9 del gen NPPB, comparando normotensas, preeclámpticas leves y graves



VII. DISCUSIÓN

La causa primaria de la preeclampsia permanece aún desconocida; sin embargo, en base a las últimas investigaciones, se ha creado la teoría, según la cual la fisiopatología de la preeclampsia se desarrolla en dos etapas²⁶:

En la primera etapa, que es asintomática y transcurre durante la primera mitad del embarazo, se produce una alteración en el proceso normal de la placentación, consistente en una invasión anormalmente superficial del citotrofoblasto, generando una insuficiente circulación placentaria. Dicha circulación placentaria deficiente provoca ciclos de hipoxia y reperfusión placentarios, que inducen un patrón de expresión genética alterado, caracterizado por la sobreproducción de factores solubles tóxicos para el endometrio.

En la segunda etapa, se expresa clínicamente la enfermedad y ocurre en la segunda mitad del embarazo, existe una producción placentaria y subsecuente liberación a la circulación materna de estos factores tóxicos para el endotelio, principalmente factores antiangiogénicos y angiogénicos, que son los mediadores más importantes de la disfunción endotelial materna sistémica, causantes de las manifestaciones clínicas de la preeclampsia, como la hipertensión arterial y la proteinuria.

Puesto que no todas las mujeres con la perfusión placentaria reducida desarrollan preeclampsia, otros factores maternos, genéticos y ambientales, deben jugar un papel adicional importante. Dado que no existe una etiología única, parece ser que la causa de la enfermedad es multifactorial, como resultado de una combinación e interrelación entre distintos factores genéticos y ambientales; que aún no han sido completamente aclarados. El factor de predisposición genética, se considera actualmente, como un factor de riesgo independiente para desarrollar la enfermedad preecláptica, y ha sido bien documentada en varios estudios⁶³⁻⁶⁸.

Por otro lado, disponemos de suficiente evidencia científica de que el desequilibrio entre los factores angiogénicos (principalmente la familia VEGF) y antiangiogénicos (principalmente sFlt-1 y endogлина soluble), es la alteración central en la patogénesis de la preeclampsia. Se conoce que existe una alteración en la expresión de ligandos y receptores de la familia VEGF por el citotrofoblasto, consistente en un incremento relativo del receptor Flt-1 soluble (sFlt-1), el cual es una variante que no está unido a la membrana celular, que circula libremente capturando VEGF e impidiendo sus acciones fisiológicas mediadas por sus receptores celulares endoteliales. De esta manera se explica el vasoespasmo y el aumento de la permeabilidad vascular, sobre todo a nivel de los endotelios fenestrados (cerebro, riñón e hígado) que son los órganos clave afectados en la patogenia de la preeclampsia.

Por su parte, está ampliamente demostrado que los péptidos natriuréticos, ANP y BNP, presentan niveles más elevados en mujeres con preeclampsia comparado con embarazadas normotensas y con ellas mismas en el puerperio, sugiriendo que se podrían utilizar en la práctica clínica como marcadores de la enfermedad

Por lo expuesto anteriormente, diseñamos un estudio, de casos y controles, para responder a la pregunta de que si la presencia de determinados polimorfismos de éstos dos genes candidatos, relacionados con la fisiopatología de la preeclampsia, que codifican las proteínas VEGF y NPPB, pueden predisponer a que una mujer desarrolle preeclampsia durante su embarazo.

Analizaremos primero las variables clínico-epidemiológicas de nuestra población de estudio, y posteriormente discutiremos la posible asociación de los polimorfismos estudiados y el desarrollo de preeclampsia en dos partes, referidas a las variantes en los genes VEGF y NPPB.

Análisis de las características de la población de estudio

Nuestro estudio de casos y controles, se realizó comparando una población de 59 pacientes con criterios diagnósticos de preeclampsia, respecto de un grupo control de 91 gestantes, que hayan tenido por lo menos, dos gestaciones a término de curso normal, sin criterios de preeclampsia; lo que minimiza el riesgo de padecer preeclampsia en algún eventual futuro embarazo, a las que denominamos normotensas.

También realizamos la comparación estadística, clasificando al grupo de casos, de acuerdo a la severidad de la enfermedad, en preeclampsia leve y preeclampsia grave; y a la edad gestacional de aparición de la misma, en preeclampsia precoz y tardía.

Ambos grupos, de preeclámpticas y normotensas, tuvieron características clínicas homogéneas, sin encontrarse diferencias significativas en cuanto a edad, índice de masa corporal, tabaquismo y raza.

Se trató de una población joven con una media de edad de 31 años, en todos los grupos y subgrupos.

El IMC fue muy comparable en todos los grupos, sin hallarse diferencias estadísticamente significativas. Aunque cabe destacar, un IMC ligeramente mayor en el grupo de preeclampsia leve (28), respecto a preeclampsia grave (25,8) y a las normotensas (24). También se observa algo parecido al comparar preeclampsia tardía (26,9), preeclampsia leve (26,4) y normotensas (24). Estos hallazgos están de acuerdo a los datos referidos en la literatura, en los cuales se mencionan al sobrepeso y obesidad, como importante factor de riesgo independiente de preeclampsia, sobre todo en los casos de debut tardío, que generalmente son casos leves²⁷.

Aunque no alcanzó la significancia estadística, el índice de tabaquismo fue menor en el grupo pacientes preeclámpticas, que en las gestantes normotensas; siendo destacable que en el grupo de preeclampsia precoz no hubiera ninguna mujer

fumadora. Estos resultados eran esperables ya que el efecto protector del hábito tabáquico frente al desarrollo de preeclampsia, es ampliamente aceptado, sobre todo en cuanto se refiere a preeclampsia precoz²⁸.

La distribución racial de nuestra población, es un reflejo de lo sucede actualmente en España, donde conviven varias razas distintas, predominando la raza caucásica, seguida por la latinoamericana, y con menor proporción de otras razas como la negra, asiática, árabe y etnia gitana. En nuestro estudio encontramos una distribución muy homogénea de razas en el grupo de preeclámpticas y normotensas, así como en la clasificación de los subgrupos de preeclampsia leve y grave, y de preeclampsia precoz y tardía. En todos los grupos predominó la raza blanca, seguida en segundo lugar por la raza latinoamericana; excepto en el subgrupo de preeclampsia precoz donde hubo más latinoamericanas. Entre estas dos razas, blanca y latinoamericana, conformaron el 90% de la población aproximadamente, en la población general y en todos los grupos y subgrupos. Las otras razas presentaron una contribución muy pequeña.

Por otro lado, en las variables referentes a resultados perinatales obtuvimos diferencias altamente significativas encontradas ($p < 0,001$), al comparar los grupos y subgrupos de casos con el grupo control. Estas diferencias se explican por los propios criterios de selección del grupo control de gestantes de bajo riesgo con embarazo no complicados, y como consecuencia del propio impacto de la patología, su grado de severidad y su precocidad, que obliga a un manejo obstétrico diferente.

De esta manera, hubo una mayor tasa de cesáreas en el grupo de preeclampsia precoz (92,3%), respecto a preeclampsia tardía (67,4%), y respecto a las normotensas (9,9%); del mismo modo, hubo una más alta tasa de cesáreas para el grupo de preeclampsia grave (84,8%), frente a la preeclampsia leve (57,7%), y frente a normotensas (9,9%).

De forma parecida, se obtuvieron recién nacidos con menor edad gestacional y menor peso al nacer en el grupo de preeclampsia grave (34,8 semanas y 2266 gramos), comparado con preeclampsia leve (38,3 semanas y 3008 gramos) y a su vez con normotensas (39,3 semanas y 3297 gramos). En el mismo sentido, la edad gestacional y el peso al nacer fue menor en el grupo de preeclampsia precoz (32,5 semanas y 2090 gramos), respecto a preeclampsia tardía (37,4 semanas y 27365 gramos) y respecto a las normotensas (39,3 semanas y 3297 gramos).

Asociación de los polimorfismos del gen VEGF y el desarrollo de preeclampsia

La predisposición genética como factor de riesgo independiente para el desarrollo de preeclampsia, está ampliamente documentada. Sin embargo aún no se conoce que patrón de herencia sigue, y en que parte del genoma humano se localiza la posible variación genética.

Dado que el VEGF juega un papel fundamental en la vasculogénesis y angiogénesis del embrión y placenta, y que además está implicada en el desequilibrio angiogénico/antiangiogénico presente en la preeclampsia; el estudio de las variantes del gen humano que codifica el VEGF, y su posible asociación con la preeclampsia, como factor de riesgo o como factor de protección, están siendo objeto de investigación actual. Dichos estudios reportados en la literatura, presentan diseños heterogéneos y algunos resultados discrepantes en cuanto a tener o no asociación estadística significativa con el desarrollo de la enfermedad.

El gen del VEGF es muy polimórfico, conteniendo muchos polimorfismos de un único nucleótido. Algunos de ellos, son polimorfismos funcionales, que pueden afectar la expresión proteica del gen. Se ha demostrado que los polimorfismos [-2578 C/A y -1154 G/A localizados en la región promotora y +936 C/T ubicado en la región del extremo 3' no traducida] presentan asociación con la expresión del gen, produciendo variaciones en la síntesis proteica del VEGF⁹⁵⁻⁹⁹.

Basados en este hallazgo, elegimos a estos polimorfismos: -2578 C/A, -1154 G/A y +936 C/T, como objeto de estudio, para tratar de establecer si existe una asociación entre estos tres polimorfismos funcionales y el riesgo de padecer preeclampsia; y además averiguar si está relacionado con la severidad de la enfermedad y/o con el momento de aparición de la misma.

○ ***Polimorfismos en la región promotora: -2578 C/A y -1154 G/A***

En correlación a lo reportado por Garza-Veloz et al, en un estudio con población mexicana, nuestro estudio tampoco encontró ninguna asociación estadística de las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs -2578 C/A, -1154 G/A con el riesgo de presentar preeclampsia, con la severidad de la enfermedad (preeclampsia grave o leve), ni con la edad gestacional de aparición de la misma (preeclampsia precoz y tardía).¹⁰⁵

Otros estudios, como el de Papazoglou y el de Banyasz que incluyeron al SNP -2578 C/A (pero no al -1154 G/A) tampoco encontraron asociación entre este polimorfismo y el riesgo de preeclampsia^{100,103}. Aunque no fue el objetivo principal de su estudio, Banyasz refiere como hallazgo secundario que el alelo -2578 A se asoció con una manifestación clínica más precoz de la hipertensión y la proteinuria; es decir, que las mujeres portadoras del alelo -2578 A, presentaron los signos de hipertensión y proteinuria, 1,6 y 1,9 semanas antes, respectivamente, que las portadoras del genotipo -2578 CC. Este hallazgo estaría en relación a lo reportado en el estudio de Shahbazi (2002), quien encontró que este alelo -2578 A, predispone a una menor capacidad de producción proteica de VEGF; sin embargo, es necesario más estudios que confirmen dicho resultado y la significancia clínica que podría tener⁹⁹. Nosotros no encontramos asociación cuando hicimos las comparaciones de la distribución de estos polimorfismos, entre el subgrupo de preeclampsia precoz, preeclampsia tardía y el grupo control.

Tampoco se ha podido encontrar asociación entre estos SNP -2578 C/A y -1154 G/A y la preeclampsia, cuando se han analizado los resultados de estudios caso-control, utilizando metaanálisis. Al respecto, han coincidido dos metaanálisis recientes, comunicados por Cheng D et al y Song GG et al, en los cuales se estudiaron además, los polimorfismos +936 C/T y -634 G/C. En el primero se incluyeron 11 estudios de tipo caso-control, con un total de 1069 pacientes y 1315 controles; y en el segundo 10 estudios caso-control, con 950 pacientes y 1118 controles; no encontrando ninguna asociación entre las frecuencias de las variantes alélicas y genotípicas de estos locis y el riesgo de desarrollar preeclampsia. Ambos estudios incluyeron poblaciones asiáticas, caucásicas y latinas^{106,107}.

Nuestros resultados, consistentes en no encontrar asociación estadística para estos polimorfismos -2578 C/A y -1154 G/A son concordantes, con la mayoría de estudios caso-control encontrados en la literatura y con los dos recientes metaanálisis que aumenta significativamente el tamaño de la población, y mejora el nivel de evidencia científica.

Sólo están en discordancia parcial con lo reportado por Sandrim VC et al, quienes realizaron un estudio comparando mujeres preeclámplicas, hipertensas gestacionales y normotensas, en una población brasileña. Debido a que la raza blanca fue la predominante (70,3%, 73,3% y 61,4% en cada grupo respectivamente), realizaron dos tipos de análisis, el primero con la población total del estudio, y en un segundo tiempo con la población de raza blanca. No encontraron diferencias significativas, cuando se realiza el análisis con la población global; sin embargo, al analizar sólo a las mujeres de raza blanca, ellos encontraron una asociación estadística significativa entre el SNP -2578 y el riesgo de padecer preeclampsia, consistente en una significativa menor frecuencia del homocigoto -2578 AA en el grupo de mujeres preeclámplicas. No hubo diferencias significativas para el SNP -1154, en ninguno de los análisis realizados. Adicionalmente comunicó que las mujeres que portaron el haplotipo -2578C, -1154G y -634C tuvieron una significativa menor frecuencia en el grupo de preeclampsia, sugiriendo un efecto protector al desarrollo de la enfermedad,

en las mujeres que portan este haplotipo en particular¹⁰⁵. Nosotros no hicimos el análisis de los polimorfismos VEGF, considerando únicamente a las mujeres de raza blanca, porque esto habría supuesto una disminución importante del poder estadístico del estudio, debido a la reducción del tamaño muestral.

○ ***Polimorfismo de la región del extremo 3', no traducido: +936 C/T***

Nosotros tampoco hallamos una asociación significativa entre las frecuencias alélicas y genotípicas de SNP +936 y el riesgo de padecer preeclampsia en el embarazo, ni con la severidad y el momento de aparición de la enfermedad.

Nuestros resultados están de acuerdo con el metanálisis de Song et al, quienes demuestran en su metaanálisis, analizando por separado los distintos grupos raciales, que el alelo +936 T no se asocia a un riesgo aumentado de preeclampsia en mujeres europeas; sin embargo esta asociación es significativa cuando se trata de mujeres asiáticas.¹⁰⁷

En contraposición, el metaanálisis de Cheng et al encuentra una asociación significativa para el SNP + 936, por la cual las mujeres portadoras del alelo T tienen más alto riesgo de presentar preeclampsia, que las portadoras del genotipo +936 CC. Este metaanálisis también encuentra una asociación positiva para el SNP -634 G/C, que no ha sido motivo de nuestro estudio. Dicho metaanálisis, incluyó poblaciones europeas, asiáticas y latinoamericanas; pero no se realizó un análisis separando las distintas razas¹⁰⁶.

De forma parecida, Shim et al, en un estudio caso-control realizado en mujeres coreanas, encuentran que las mujeres portadoras del alelo +936 T se encuentran en una proporción significativamente mayor en el grupo de preeclampsia comparando con el grupo de normotensas; por lo que sugieren que las portadoras de este alelo tendrían una susceptibilidad incrementada para el desarrollo de la enfermedad, considerándolo como posible factor de riesgo independiente de preeclampsia¹⁰¹.

Estos resultados, que demuestran esta asociación entre el SNP + 936 C/T y la preeclampsia, son coherentes con el estudio de Renner et al (2000), quienes demostraron que este polimorfismo es un importante determinante de los niveles séricos de VEGF, teniendo los sujetos portadores del alelo T valores de VEGF significativamente menores que los portadores del genotipo +936 CC⁹⁶. Por su parte, Papazoglou et al en su estudio que también incluyó a los SNP -2578 C/A, -634 G/C y + 936 C/T, sólo encontró como resultado relevante que la presencia del alelo 936 T, se asocia con preeclampsia grave, postulando que aunque los SNP del gen VEGF estudiados, tienen poco peso como factores de riesgo independientes de la enfermedad, el SNP +936 podría jugar un papel como modificador del grado de severidad de la preeclampsia¹⁰⁰.

Las discrepancias entre los resultados de los distintos estudios reportados en la literatura, creemos que se podrían explicar debido a que están realizados con diferentes grupos raciales, con distintos criterios de inclusión respecto del grupo control, y con tamaños muestrales relativamente pequeños.

Nuestra población estudiada, está conformada predominantemente por raza caucásica, seguida por la raza latinoamericana. Como ya se mencionó, no realizamos un análisis específico, considerando las razas por separado porque esto provocaría una disminución importante del tamaño muestral y por tanto del poder estadístico.

También son muy heterogéneos los criterios de selección para conformar los grupos de control que nos permiten la comparación, incluyendo para ello según el estudio a mujeres postmenopáusicas con por lo menos dos embarazos sin preeclampsia, a mujeres con embarazo sin complicaciones, o a gestantes normotensas nulíparas. Nosotros consideramos como grupo control a mujeres multíparas, con al menos dos embarazos a término de bajo riesgo, que no hubieran presentado criterios diagnósticos de hipertensión arterial en ninguno de sus embarazos; con el fin de hacer muy improbable el desarrollo de preeclampsia en un eventual futuro embarazo.

Los tamaños de muestra son relativamente pequeños, porque la prevalencia de la enfermedad es baja, sobre todo en España, que presenta una de las incidencias más bajas de preeclampsia en el mundo. Los metaanálisis, al incluir varios estudios nos ayudan a paliar esta deficiencia.

Asociación del polimorfismo del gen NPPB y el desarrollo de preeclampsia

Existe amplia evidencia de que los péptidos natriuréticos incrementan sus niveles de forma significativa en las pacientes que desarrollan preeclampsia en comparación con las normotensas, normalizando sus valores tras el parto. Estos hallazgos sugieren que juegan un rol como mediadores en la patogenia de la enfermedad; aunque se desconoce si es un factor causal o uno de los efectos dentro de la compleja fisiopatología de la enfermedad¹¹⁷⁻¹²⁶. Se ha sugerido por ello, que podrían ser utilizados como marcadores de preeclampsia, de manera similar a como se están utilizando actualmente como marcadores de función ventricular y de pronóstico de insuficiencia cardíaca congestiva.

Basados en estas observaciones, se ha iniciado una línea de investigación nueva, referida al estudio de estos genes candidatos que codifican las proteínas precursoras de los péptidos natriuréticos, que están localizados en el brazo corto del cromosoma humano 1, banda p36¹¹¹.

El gen del pre - propéptido del BNP (NPPB), ha sido estudiado inicialmente como un gen candidato para hipertensión arterial esencial. Ogawa et al demostró que una región localizada en el extremo 5' del gen NPPB, que contiene 1,9 kilo pares de bases de nucleótidos, era la responsable de una importante actividad transcripcional. Esta secuencia tienen una región característica rica en CT (-1248 a -1191), seguida por un tipo de secuencia de repetición móvil, conocida como secuencia Alu (-1190 a -934), por lo que planteó la hipótesis de que las secuencias de repeticiones Alu podrían tener un rol regulatorio en la expresión del gen NPPB¹²⁷.

Por esta razón Kosuge K et al , estudiaron esta región del gen, descubriendo un nuevo polimorfismo genético, del tipo de repeticiones variables, consistente en la repetición en un número variable de veces, de una secuencia corta de 4 nucleótidos (TTTC), localizada en ésta región, adyacente al extremo 5' del gen del NPPB (-1241 nucleótidos desde el sitio de iniciación transcripcional), que podría estar asociada a hipertensión arterial esencial en una población de mujeres japonesas. En este estudio, se encontraron 8 alelos y 12 genotipos distintos, reportándose como resultado significativo, que en el grupo de mujeres hipertensas una frecuencia menor de alelos de 16 repeticiones, comparado con el grupo de mujeres normotensas. No se encontró ninguna diferencia significativa en la distribución de alelos, en el caso de los varones.

128

Los polimorfismos de repeticiones variables en tándem, son muy usados como posibles factores de riesgo de padecer enfermedades y con fines diagnósticos debido a que pueden actuar como reguladores transcripcionales y traslacionales, modificando la función de la proteína que codifican, por esta razón y con los resultados del estudio de Kosuge et al, se ha continuado investigando el posible papel de este polimorfismo descrito, en el riesgo de padecer preeclampsia.

Szabó G et al , estudió este polimorfismo de repetición TTTC en una población húngara, reportando que las mujeres preeclámplicas tenían una significativa mayor frecuencia de genotipos y alelos de 11 repeticiones; y por el contrario una significativa menor frecuencia de alelos de 12 repeticiones. Ellos encontraron mayor variedad genotípica, con un total de 12 alelos y 35 genotipos, atribuyéndolo a que su población húngara, es racialmente más variada que la japonesa. También determinaron los niveles séricos de BNP, encontrando mayores niveles de este factor natriurético en las mujeres preeclámplicas, como lo refieren todos los estudios de la literatura; pero además encontraron significativos mayores niveles de BNP en las mujeres con genotipo homocigoto 11/11¹²⁹.

En nuestra población de estudio, encontramos diez alelos distintos, combinados en diecinueve genotipos diferentes; situándonos en una posición intermedia entre los resultados del estudio japonés (8 alelos y 12 genotipos), y del estudio con población húngara (12 alelos y 35 genotipos), teniendo en España una población racialmente variada.

En nuestro estudio encontramos como un hallazgo nuevo e interesante, la existencia de alelos con menor número de repeticiones de la secuencia TTTC. Así encontramos alelos de 6 y 7 repeticiones que no habían sido reportados en los estudios previos; puesto que en el estudio de Kosuge¹²⁸ se describen alelos de 9 a 16 repeticiones, y en el estudio de Szabó¹²⁹, alelos de 8 a 20 repeticiones. Nosotros encontramos alelos en el rango de 6 a 16 repeticiones.

Además, encontramos que éstos diez alelos, se distribuyeron de forma asimétrica, predominando claramente el alelo de 7 repeticiones, que se presentó en el 62,9% de normotensas y en el 64,4 % de preeclámpticas; y el genotipo homocigoto 7/7 que se presentó en el 42,4 % de preeclámpticas y en el 52,8 % de normotensas. Este resultado no está de acuerdo con los estudios previos, en los que se reportaron una mayor frecuencia del genotipo homocigoto 11/11, presente en el 77% de hipertensos esenciales y en el 83,3% de normotensos en el estudio de Kosuge et al¹²⁸, y en el 25% de preeclámpticas y en el 32 % de normotensas en el estudio de Szabó¹²⁹.

Cuando comparamos la distribución de alelos y genotipos de este polimorfismo, entre los distintos grupos, no encontramos diferencias significativas al comparar las mujeres con preeclampsia leve, grave y normotensas ($p=0,05$). Tampoco hubo diferencias significativas al comparar preeclampsia precoz y tardía. Debido a la amplia variedad de alelos y genotipos, y a que algunos de éstos se encuentran en una frecuencia muy baja que no nos permiten establecer comparaciones claras, realizamos un segundo análisis estadístico, clasificando los genotipos de la población en tres categorías: homocigotos, heterocigotos, y otros genotipos distintos, para cada uno de los alelos encontrados (alelos 6,7,8,9,10,11,12,13,14,16).

Dicho análisis difiere del estudio de Szabó et al ¹²⁹, puesto que obtuvimos asociación estadística significativa entre el alelo 7 y el riesgo de padecer preeclampsia.

De manera que los genotipos del alelo 7 son significativamente más frecuentes en las pacientes con preeclampsia, comparadas con el grupo control de normotensas.

Adicionalmente se encontró que los genotipos del alelo 9 son significativamente más frecuentes en el subgrupo de pacientes con preeclampsia leve comparadas con las normotensas. Dichos datos sin embargo no son consistentes porque no se halla dicha diferencia, cuando se comparan preeclámpticas con normotensas.

No disponemos de más estudios en la literatura que estudien la relación de este polimorfismo del gen NPPB con la preeclampsia, que el realizado por Szabó¹²⁹. Siendo necesarios otros estudios, que nos permitan comparar nuestros resultados y confirmar o no nuestros hallazgos.

Finalmente debemos tener en consideración algunas limitaciones propias de nuestro estudio:

Contamos con un reducido tamaño de muestra, como los demás estudios de casos-control, por tratarse de una patología médica de baja incidencia. Esto nos puede generar sesgos al intentar analizar la asociación de los polimorfismos a nivel de los grupos y subgrupos; por lo cual ampliaremos nuestro estudio para aumentar nuestro poder estadístico y confirmar nuestros resultados obtenidos.

Un mejor diseño del estudio, debería incluir la determinación de los niveles séricos de las proteínas codificadas por estos genes, VEGF y NPPB; de manera que podríamos obtener datos más directos respecto a cómo influyen los polimorfismos estudiados en la expresión del gen, aumentando o disminuyendo la producción proteica y poder correlacionarlo con el riesgo de padecer preeclampsia.

No hemos encontrado en la literatura, ningún estudio español que estudie la susceptibilidad genética de la preeclampsia asociada a los variantes genotípicas del

gen VEGF ni del gen NPPB, por lo que el nuestro sería el primer reporte que estudie los SNPS -2578 C/A , -1154 G/A y +936 C/T del gen VEGF; y el polimorfismo de repetición TTTC del gen NPPB, en población española.

VIII. CONCLUSIONES

1. La distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos del gen VEGF estudiados, -2578 C/A, -1154 G/A y +936 C/T, no se asociaron con el riesgo de padecer preeclampsia en el embarazo.
2. La distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos del gen VEGF estudiados, -2578 C/A, -1154 G/A y +936 C/T, no se asociaron con el grado de severidad de la preeclampsia.
3. La distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos del gen VEGF estudiados, -2578 C/A, -1154 G/A y +936 C/T, no se asociaron con el momento de aparición de la preeclampsia, durante el embarazo.
4. En el estudio del polimorfismo de repetición TTTC del gen NPPB, encontramos que el alelo más frecuente fue el de 7 repeticiones, y el genotipo más frecuente fue el homocigoto 7/7, tanto en el grupo de preeclámpticas como en el de normotensas.
5. La presencia de los genotipos del alelo de 7 repeticiones, se asoció significativamente al riesgo de padecer preeclampsia en nuestra población de estudio.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol* 2009; 33(3): 130–7.
2. Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gulmezoglu AM, Van Look PFA. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet* 2006; 367: 1066–74.
3. The Magpie Trial Collaborative Group. Do women with pre-eclampsia, and their babies, benefit from magnesium sulphate? The Magpie Trial: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002; 359: 1877-90.
4. Berg CJ, Mackay AP, Qin C, Callaghan WM. Overview of maternal morbidity during hospitalization for labor and delivery in the United States: 1993–1997 and 2001–2005. *Obstet Gynecol.* 2009;113: 1075–81.
5. Wallis AB, Saftlas AF, Hsia J, Atrash HK. Secular trends in the rates of preeclampsia, eclampsia, and gestational hypertension, United States, 1987–2004. *Am J Hypertens* 2008; 21: 521–26.
6. Caughey AB, Stotland NE, Washington AE, Escobar GJ. Maternal ethnicity, paternal ethnicity, and parental ethnic discordance: predictors of preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2005; 106: 156–61.
7. Rao AK, Cheng YW, Caughey AB. Perinatal complications among different Asian-American subgroups. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194: e39–41.
8. Sibai B, Dekker G, Kupfermine M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005;365:785-99.
9. Comino R. Hypertensive states of pregnancy in Spain. *Clin Expert Hypert.* 1986, B5.217-30.
10. Comino R, Barahona M, Bartha J. Hipertensión y embarazo. .Cádiz: Servicio de Publicaciones. Universidad de Cádiz, 1995.2000;183:S1-S23.
11. Cortés S, Pérez F, Gobernado JA, Mora P. Epidemiología de los estados hipertensivos del embarazo. *Clin Invest Gin Obst.* 2009;36(4):132–139.
12. Curiel-Balsera E, Prieto-Palomino MA, Muñoz-Bono J, Ruiz de Elvira MJ, Galeas JL, Quesada G. Análisis de la morbimortalidad materna en las pacientes con preeclampsia grave, síndrome HELLP que ingresaron en una Unidad de Cuidados Intensivos gineco-obstétrica. *GClin Invest Gin Obst.* 2009;36(4):132–139.

13. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 2000; 183:S1-S23.
14. Milne F, Redman C, Walker J, et al. The pre-eclampsia community guideline (PRECOG): how to screen for and detect onset of preeclampsia in the community. *BMJ* 2005; **330**: 576–80)
15. Sibai BM. Diagnosis, controversies, and management of HELLP syndrome. *Obstet Gynecol* 2004; 103:981-91.
16. Steegers EA, Von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg. Pre-eclampsia. *Lancet* 2010; 376: 631-44.
17. Quinn M. Automated blood pressure measurement devices: a ptential source of morbidity in preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170: 1303-07.
18. Higby K, Suiter CR, Phelps JY, Siler-Khodr T, Langer O. Normal values of urinary albumni and total protein excretion durin g pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171: 984-89)
19. How HY, Sibai B, Lindheimer M, Caritis S, Haugth J, Klebanoff M et al. Is early-pregnancy proteinuria associated with an increased rate of preeclampsia in womwn with pregestational diabetes mellitus? *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190:775.78.
20. Cote Am, Firoz t, Mattman A, Lam EM, Von DP, Magee LA. The 24-hour urine collection: gold standard or historical practice? *Am J Obstet Gynecol* 2008;199:625-26.
21. Waugh JJ, Clark TJ, Divakaran TG, Khan KS, Kulby MD. Accuracy of urinalysis disptick techniques in predicting significant proteinuria in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2004;103:769-77.
22. Pappana R, Mann LK, Kouides RW, Glantz JC. Protein/creatinine ratio in preeclampsia: a systematic review. *Obstet Gynecol* 2008; 112:135.44)
23. Menzies J, Magee LA, Macnab YC, Ansermino JM, Li J, Douglas MJ et al. Current CHS and NHBPEP criteria for severe preeclampsia do not uniformly predict

- adverse maternal or perinatal outcomes. *Hypertens Pregnancy* 2007; 26:447-62.
24. National Institute for Clinical Excellence. NICE Guideline CG6: antenatal care-routine care for the healthy pregnant woman. 2003. Disponible en www.nice.org.uk.
25. Raymond D, Peterson E. A critical review of early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv*. 2011 aug;66(8):497-506.)
26. Huppertz B. Placental origins of preeclampsia. Challenging the current hypothesis. *Hypertension* 2008; 51: 970-5)
27. Lisonkova S, Joseph KS. Incidence of preeclampsia: risk factors and outcomes associated with early- versus late-onset disease. *Am J Obstet Gynecol*. 2013 Dec;209(6):544.e1-12. doi: 10.1016/j.ajog.2013.08.019.
28. Aksornphusitaphong A, Phupong V. Risk factors of early and late onset preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Res*. 2013 MAR;39(3):627–31.
29. Ogge G, Chaiworapongsa T, Romero R, Hussein Y, Kusanovic JP, Yeo L, Kim CJ, Hassan S. Placental lesions associated with maternal underperfusion are more frequent in early-onset than in late-onset preeclampsia. *J Perinat Med*. 2011 Nov;39(6):641–52.
30. Kovo M, Schreiber L, Ben-Haroush A, Gold E, Golan A, Bar J. The placental component in early-onset and late-onset preeclampsia in relation to fetal growth restriction. *Prenat Diagn*. 2012 Jul;32(7):632–7.
31. Raymond D, Peterson E. A critical review of early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv*. 2011 aug;66(8):497-506.
32. Nelson DB, Ziadie MS, McIntire DD, Rogers BB, Leveno KJ. Placental pathology suggesting that preeclampsia is more than one disease. *Am J Obstet Gynecol* 2014;210(1):66.e1-7.

33. Sohlberg S, Mulic-Lutvica A, Lindgren P, Ortiz-Nieto F, Wikström AK, Wikström J. Placental perfusion in normal pregnancy and early and late preeclampsia: A magnetic resonance imaging study. *Placenta*. 2014 Mar;35(3):202-6.
34. Soto E, Romero R, Kusanovic JP, Ogge G, Hussein Y, Yeo L, Hassan SS, Kim CJ, Chaiworapongsa T. Late-onset preeclampsia is associated with an imbalance of angiogenic and anti-angiogenic factors in patients with and without placental lesions consistent with maternal underperfusion. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012 May;25(5):498–507.).
35. Nevo O, Soleymanlou N, Wu Y, Xu J, Kingdom J, Many A, Zamudio S, Caniggia I. Increased expression of sFlt-1 in in vivo and in vitro models of human placental hypoxia is mediated by HIF-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006 Oct;291(4):1085-93.
36. Wikstrom AK, Larsson A, Eriksson UJ, Nash P, Nordén-Lindeberg S, Olovsson M. Placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase-1 in early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 2007 Jun;109(6):1368-74.
37. Tobinaga CM, Torloni MR, Gueuvoghlian-Silva BY, Pendeloski KPT, Akita PA, Sass N, Daher S. Angiogenic factors and uterine doppler velocimetry in early- and late-onset preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2014 May;93(5):469–76.
38. Espinoza J. Angiogenic imbalances in the pathogenesis of pregnancy complications. *Fetal Matern Med Rev*. 2014 Feb;25(1):42–58.
39. Caniggia I, Winter J, Lye SJ, Post M. Oxygen and placental development during de first trimester: Implications for the pathophysiology of preeclampsia. *Placenta* 2000; 21: S25 S30)
40. Kharfi A, Giguere Y, Clin Sapin V, Masse J Dastugue B, Forest JC. Trophoblastic remodeling in normal and preeclamptic pregnancies: Implications of cytokines. *Clin Biochem* 2003; 36: 1323-31.)

41. Li H, Dakour J, Guilbert LJ, Winkler-Lowen B, Lyall F, Morrish DW. PL74, a novel member of the transforming growth factor-beta superfamily, is overexpressed on preeclampsia and causes apoptosis in trophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90: 3045-53.
42. Goldman-Wohl D, Yagel S. Preeclampsia a placenta developmental biology perspective. *J Reprod Immunol* 2009; 82: 96-99.
43. Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennet WA, Khalil RA. Pathophysiology of preeclampsia: linking placental ischemia/hypoxia with microvascular dysfunction. *Microcirculation* 2002; 9: 147-60.
44. De Wolf F, De Wolf-Peeters C, Brosen I, Robertson WB. The human placental bed: electron microscopic study of trophoblastic invasion of spiral arteries. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 137: 58-70.
45. Zhou Ym, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest* 1997; 99: 2192-64.
46. Kopcow HD, Karumanchi SA. Angiogenic factors and natural killer (NK) cells in the pathogenesis of preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2007;76:23–9.
47. Chaiworapongsa T, Romero R, Espinoza J, Bujold E, Mee Kum Y, Goncalves LF et al. Evidence supporting a role for blockade of the vascular endothelial growth factor system in the pathophysiology of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 190:1541-47.)
48. Silasi M, Cohen B, Karumanchi SA, et al. Abnormal placentation, angiogenic factors, and the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Clin N Am* 2010; 37: 239-53.
49. Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *Febs Lett* 2006; 580:2879-87.).

50. Demir R, Seval Y, Huppertz B. Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *Acta Histochem* 2007; 109:257-265).
51. Brockelsby J, Hayman R, Ahmed A, Warren A, Johnson I and Baker P. VEGF via VEGF receptor-1 (Flt-1) mimics preeclamptic plasma in inhibiting uterine blood vessel relaxation in pregnancy: implications in the pathogenesis of preeclampsia. *Lab Invest* 1999; 79: 1101–1111.
52. Baker PN, Krasnow J, Roberts JM and Yeo KT. Elevated serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1995; 86: 815–821,
53. Kupferminc MJ, Daniel Y, Englender T, Baram A, Many A, Jaffa AJ, Gull I and Lessing JB. Vascular endothelial growth factor is increased in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1997; 38: 302–306.
54. Hunter A, Aitkenhead M, Caldwell C, McCracken G, Wilson D and McClure N (2000) Serum levels of vascular endothelial growth factor in preeclamptic and normotensive pregnancy. *Hypertension* 2000; 36: 965–969.
55. Lyall F, Greer IA, Boswell F and Fleming R. Suppression of serum vascular endothelial growth factor immunoreactivity in normal pregnancy and in pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynecol* 1997; 104: 223–228.
56. Maynard SE, Min JY, Merchan J, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003;111:649-58.
57. Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, Gerber HP, Kikkawa Y, Miner JH and Quaggin SE. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest* 2003; 111: 707–716.
58. Bdoah Y, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Angiogenic imbalance in the pathophysiology of preeclampsia; newer insights. *Semin Nephrol* 2004; 24: 548-56).

59. Li H, Gu B, Zhang Y, Lewis DF, Wang Y. Hypoxia-induce increase in soluble Flt-1 production correlates with enhanced oxidative stress in trophoblast cells from the human placenta. *Placenta* 2005; 26(2-3):210-217.
60. Simmons LA, Hennessy A, Gillin AG and Jeremy RW (2000) Uteroplacental blood flow and placental vascular endothelial growth factor in normotensive and pre-eclamptic pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 107,678–685.
61. Trollmann R, Amann K, Schoof E, Beinder E, Wenzel D, Rascher W and Dotsch J. Hypoxia activates the human placental vascular endothelial growth factor system in vitro and in vivo: up-regulation of vascular endothelial growth factor in clinically relevant hypoxic ischemia in birth asphyxia. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188,517–523.
62. Stevens JM. Gynaecology from ancient Egypt: the papyrus Kahun—a translation of the old treatise of gynaecology that has survived from the ancient world. *Med J Aust* 1975; 2: 949–52.).
63. Chesley LC. Hypertensive disorders or pregnancy. New York, NY, USA: Appleton-Century-Crofts, 1978.
64. Davies AM. Geographical epidemiology of the toxemias of pregnancy. Israel: Charles C Thomas, 1971.).
65. Salonen RH, P. Lichtenstein P, Lipworth L, Cnattingius S, Genetic effects on the liability of developing pre-eclampsia and gestational hypertension. *Am J Med Genet* 2000; 91: 256–260.
66. Treloar SA, Cooper DW, Brennecke SP, Grehan MM, Martin NG. An Australian twin study of the genetic basis of preeclampsia and eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184: 374–381.
67. S. Cnattingius S, M. Reilly M, Y. Pawitan Y, P. Lichtenstein P. Maternal and fetal genetic factors account for most of familial aggregation of preeclampsia: a population-based Swedish cohort study. *Am J Med Genet* 2004; A 130A: 365–372.

68. Skjaerven R, Vatten LJ, Wilcox AJ et al. Recurrence of pre-eclampsia across generations: exploring fetal and maternal genetic components in a population based cohort. *BMJ* 2005; 331: 877.
69. Cooper DW, Brennecke SP & Wilton AN. Genetics of pre-eclampsia. *Hypertens Pregnancy* 1993; 12: 1–23.).
70. Haig D. Genetic conflicts in human pregnancy. *Q Rev Biol* 1993; 68: 495–532.
71. GOPEC. Disentangling fetal and maternal susceptibility for pre-eclampsia: a British multicenter candidate-gene study. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 127–131).
72. Arngrimsson R, Sigurardottir S, Frigge ML et al. A genome-wide scan reveals a maternal susceptibility locus for preeclampsia on chromosome 2p13. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1799–1805.
73. Laivuori H, Lahermo P, Ollikainen V et al. Susceptibility loci for preeclampsia on chromosomes 2p25 and 9p13 in Finnish families. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 168–177).
74. Lachmeijer AM, Arngrimsson R, Bastiaans EJ et al. A genome-wide scan for preeclampsia in the Netherlands. *Eur J Hum Genet* 2001; 9: 758–764.
75. Akolekar R, EtcheGARAY A, Zhou Y et al. Maternal serum activin A at 11–13 weeks of gestation in hypertensive disorders of pregnancy. *Fetal Diagn Ther* 2009; 25: 320–327.
76. Roten LT, Johnson MP, Forsmo S et al. Association between the candidate susceptibility gene ACVR2A on chromosome 2q22 and pre-eclampsia in a large Norwegian population-based study (the HUNT study). *Eur J Hum Genet* 2009; 17: 250–257.
77. Fitzpatrick E, Johnson MP, Dyer TD et al. Genetic association of the activin A receptor gene (ACVR2A) and pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2009; 15: 195–204.
78. Riento K & Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 446–456.

79. Kandabashi T, Shimokawa H, Miyata K et al. Inhibition of myosin phosphatase by upregulated rho-kinase plays a key role for coronary artery spasm in a porcine model with interleukin-1beta. *Circulation* 2000; 101: 1319–1323.
80. Ark M, Yilmaz N, Yazici G et al. Rho-associated protein kinase II (rock II) expression in normal and preeclamptic human placentas. *Placenta* 2005; 26: 81–84).
81. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, et al. Molecular and biological properties of de vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 1992; 13:18-32.
82. Demir R, Kayisli Ua, Seval Y, et al. Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during very early pregnancy: differences between placental vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta* 2004; 25:560-72.
83. Vicenti V, cassano C, Rocchi M, et al. Assignment of the vascular growth endothelial factor gene to human chromosome 6 p 21.3. *Circulation* 1996; 93. 1493-6.)
84. De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, et al. The fms-like tirosin kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255:989-91.
85. Terman BI, Dougher-Vermezen M, Carrion ME, et al. Identification of the KDR tyrosine kynase as a receptor for vascular endothelial growth factor. *Biochem Biofhs Res Commun* 1992; 187:1579-86.
86. Li X, Kumar A, Zhang F, Lee Chunsik, Tang Z. Complicated life, complicated VEGF-B. *Trens in Molecular Medicine* 2012; 18(2): 119-127.
87. Michenko A, Bauer T, Salceda S, et al. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vivo and in vitro. *Lab Invest* 1994; 71:374-9.
88. Gargett CE, Lederman F, Heryanto B, Gambino LS, Rogers PAW. Focal vascular endothelial growth factor correlates with angiogenesis in human endometrium. Role of intravascular neutrophils. *Human Reproduction* 2001; 16: 1065–1075.

89. Wang A, Rana S, Karumanchi SA. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology* 2009; 24(3): 147-158
90. Zhou Y, McMaster M, Woo K, et al. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol* 2002; 160:1405-23.
91. Ahmad S, Ahmed A. Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-I inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ Res* 2004:884-91.
92. Chaiworapongsa T, Romero R, Kim YM, et al . Plasma soluble soluble vascular endothelial growth factor receptor-I concentration is elevated prior to the clinical diagnosis of preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2005; 17:3-18.
93. Smith GC, Crossley IA, Aitken DA, et al. Circulating angiogenic factors in early pregnancy and the risk of preeclampsia, intrauterine growth restriction, spontaneous preterm birth, and stillbirth. *Obstet gynecol* 2007; 109:1316-24.
94. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 140:947-59.
95. Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine* 2000; 12:1232-35.
96. Renner W, Kotschan S, Hoffman C, et al. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial factor plasma levels. *J Vasc Res* 2000; 37: 443-48).
97. Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Maltezos E, Sivridis E. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004; 46:293-8.

98. Yang B, Cross DF, Ollerenshaw M, Millward BA, Demaine AG. Polymorphisms of the vascular endothelial growth factor and susceptibility to diabetic microvascular complications in patients with type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2003; 17:1-6.
99. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV, Harden PN. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 260-4.
100. Papazoglou D, Galazios G, Koukourakis M, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and preeclampsia. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 321-24.
101. Shim JY, Jun JK, Jung BK, et al. Vascular endothelial growth factor gene +936C/T polymorphism is associated with preeclampsia in Korean women. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197:271-4.
102. Kim YJ, Park BH, Park H, et al. No association of the genetic polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase, dimethylarginine dimethylaminohydrolase, and Vascular endothelial growth factor with preeclampsia in Korean populations. *Twin Res Hum Genet* 2008; 11: 77-83.
103. Banyasz I, Szabó S, Bokodi G, et al. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in severe pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2006; 12:233-6.
104. Sandrim VC, Palei ACT, Cavalli RC, et al. Vascular endothelial growth factor genotypes and haplotypes are associated with pre-eclampsia but not with gestational hypertension. *Mol Hum Reprod* 2009; 15:115-20.
105. Garza-Veloz I, Castruita-De la Rosa C, Cortes-Flores R, Martinez-Gaytan V, Rivera-Muñoz JE, García-Mayorga EA, et al. No association between polymorphisms/haplotypes of vascular endothelial growth factor gene and preeclampsia. *BMC Pregnancy Childbirth* 2011; 11:35.

106. Cheng D, Hao Y, Zhou W, Ma Y. Vascular endothelial growth factor +936C/T,, -634G/C, -2578C/A, and -1154G/A polymorphisms with risk of preeclampsia: a meta-analysis. *Plos ONE* 2013; 8(11):e78173.
107. Song GG, Kim JH, Lee YH. Associations between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and preeclampsia susceptibility: a meta-analysis. *Inmunol invest* 2013; 42(8): 749-62.
108. Almenar Bonet L, Martínez-Dolz L. Péptidos natriuréticos en insuficiencia cardíaca. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2006;6(F):15-26.
109. McDonagh TA, Robb SD, Murdoch DR, Morton JJ, Ford I, Morrison CE, et al. Biochemical detection of left-ventricular systolic dysfunction. *Lancet* 1998;351:9–13.
110. Tulevski II, Groenink M, van der Wall EE, van Veldhuisen DJ, Boomsma F, Stoker J, et al. Increased brain and atrial natriuretic peptides in patients with chronic right ventricular pressure overload: correlation between plasma neurohormones and right ventricular dysfunction. *Heart* 2001;86:27–30.
111. Arden KC, Viars CS, Weiss S, Argentin S, Nemer M. Localization of the human B-type natriuretic peptide precursor gene to chromosome 1p36. *Genomics.* 1995; 26:385-9)
112. Seilhamer JJ, Arsften A, Miller JA, et al. Human and canine gene homologs of porcine brain (natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;165:650-8
113. Kim H, Januzzi JL. Natriuretic Peptide Testing in Heart Failure. *Circulation* 2011;123:2015-2019.
114. Kuhn M. Molecular physiology of natriuretic peptide signaling. *Basic Res cardiol.* 2004;99:76-8.
115. Jarolim P. Serum biomarkers for heart failure. *Cardiovascular Pathology* 2006; 15(3): 144-49.

116. Heidenreich PA, 2004, Gubens MA, Fonarow GC, Konstam MA, Stevenson LW, Shekelle PG. Cost-effectiveness of screening with B-type natriuretic peptide to identify patients with reduced left ventricular ejection fraction. *Journal of the American College of Cardiology* 2004; 43(6): 1019-26.
117. Lowe SA, Macdonald GJ, Brown MA. Regulation of atrial natriuretic peptide release in pregnancy: responses to posture. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165(3): 591-5.
118. Reskin JM , Hong Ch, Resnik R, Kazanegra R, et al. Evaluation of B-type natriuretic peptide levels in normal and preeclamptic women. *Am J Obstet Gynecol*. 2005; 193:450-454.
119. Tihonen KM, Koobi T, Vuolteencho O, Huntale HS, Votila JT. Natriuretic peptides and hemodynamics in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196: 328.e1-e7)
120. Kale A, Kale E, Yalinkaya A, et al. The comparison of amino Terminal pro-brain natriuretic peptide levels in preeclampsia and normotensive pregnancy. *J Perinat Med* 2005; 33(2): 121-124.
121. Kaaja RJ, Moore MP, Yandle TG, Ylikorkala O, et al. Blood pressure and vasoactive hormones in mild preeclampsia and normal pregnancy. *Hypert pregnancy* 1999; 18(2): 173-187.
122. Stepan H, Faber R, Walter D, Walter T. C-type natriuretic peptide levels in women with gestational hypertension and preeclampsia. *Obst Gynecol*. 1999, 93(2): 199-202.
123. Itoh H, Sagawa N, Mori T, et al. Plasma brain natriuretic peptide level in pregnant women with pregnancy-induced hypertension. *Obstet Gynecol* 1993; 82:71-77).

124. Pouta AM, Voulteenahe OJ, Laatikainen TJ. An increase of the plasma Nterminal peptide of proatrial natriuretic peptide in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1997; 89(5): 747-753.
125. Okuno S, Hamada H, Yasouka m, Watanabe H, et al. Brain natriuretic peptide (BNP) and cyclic guanosin monophosphate (cGMP) levels in normal pregnancy and preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Res* 1999; 25(6): 407-410.
126. Borghi C, Esposti DD, Immordino V, et al. Relationship of systemic hemodynamics, left ventricular structure and function, and plasma peptide concentrations during pregnancy complicated by preeclampsia. *Am J Obst Gynecol*. 2000;183:140-147.
127. Ogawa Y, Itoh H, Nakagawa O, et al. Characterization of de 5`-flanking region and chromosomal assignment of the human brain natriuretic peptide gene. *J Mol Med* 1995; 73: 457-63.
128. Kosuge K, Soma M, Nakayama T, Aoi N, Sato M, Izumi Y et al . A novel variable number of tandem repeat of natriuretic peptide precursor B gene's 5-flnaking region is associated with essencial hypertension among japanese females. 2007. 4(3):146-52.
129. Szabo G, Molvarec A, Stenczer B, Rigo J, NagyB. Natriurectic peptide precursor B gene (TTTC)n microsatellite polymorphism in pre-eclampia. *Clinica Chimica Acta*. 2011; 412:1371-5.
130. Iniesta R, Ginó E, Moreno V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit* 2005; 19(4): 333-41.